

(11) Numéro de publication:

**0 307 285
A1**

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 88402198.1

(51) Int. Cl.⁴: **C 12 N 5/00**

(22) Date de dépôt: 01.09.88

C 12 N 15/00, C 12 P 21/02

(30) Priorité: 01.09.87 FR 8712166

(43) Date de publication de la demande:
15.03.89 Bulletin 89/11

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: **SANOFI, société anonyme**
40, Avenue George V
F-75008 Paris (FR)

(72) Inventeur: **Lupker, Johannes**
9, rue Léon Viala
F-31520 Ramonville-Saint-Agne (FR)

Miloux, Brigitte
Chemin de Safrana
F-31450 Montgiscard (FR)

Roskam, Willem
Majouret
F-31450 Montgiscard (FR)

(74) Mandataire: **Gillard, Marie-Louise et al**
Cabinet Beau de Loménie 55, Rue d'Amsterdam
F-75008 Paris (FR)

(54) **Cellules eucaryotes recombinées productrices, d'interleukine-2, procédé et vecteurs pour leur obtention et procédé d'obtention d'interleukine-2.**

(57) L'invention concerne des cellules eucaryotes recombinées productrices d'interleukine-2 qui contiennent, avec les moyens nécessaires à leur expression, une séquence d'ADN codant pour la dihydrofolate réductase et une séquence d'ADN codant pour un précurseur hybride de l'interleukine-2 dont le peptide-signal est celui de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine.

L'invention concerne également le procédé et les vecteurs pour l'obtention de ces cellules ainsi que le procédé d'obtention d'interleukine-2 à partir de celles-ci.

Application : Production d'interleukine-2.

EP 0 307 285 A1

Description

Cellules eucaryotes recombinées productrices d'interleukine-2, procédé et vecteurs pour leur obtention et procédé d'obtention d'interleukine-2.

5 La présente invention concerne des cellules eucaryotes recombinées productrices d'interleukine-2. Elle concerne également un procédé et les vecteurs pour l'obtention de ces cellules. Enfin, elle a aussi pour objet l'obtention d'interleukine-2 par mise en culture desdites cellules.

10 Les cellules eucaryotes selon l'invention contiennent, avec les moyens nécessaires à leur expression, une séquence d'ADN codant pour la dihydrofolate réductase et une séquence d'ADN codant pour un précurseur hybride de l'interleukine-2 dont le peptide-signal est celui de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine.

15 Ces cellules eucaryotes recombinées sont obtenues par le procédé qui consiste à transfecter des cellules eucaryotes à l'aide d'un vecteur portant, avec les moyens nécessaires à leur expression, une séquence d'ADN codant pour la dihydrofolate réductase et une séquence d'ADN codant pour un précurseur hybride de l'interleukine-2 dont le peptide-signal est celui de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine et à sélectionner les cellules transfectées, productrices d'interleukine-2, par croissance dans des milieux successifs, présentant l'un par rapport au précédent une concentration accrue en méthotrexate.

20 L'interleukine-2 est une lymphokine : elle est sécrétée par les lymphocytes-T matures des mammifères en réponse à une activation par un antigène ou un composé mitogène. Elle joue un rôle essentiel en agissant, sur la prolifération et la différenciation de différents types de cellules impliquées dans les réponses immunitaires (Robb, R.J. (1984) Immunol. Today, 5, 203-209).

25 L'interleukine-2 d'origine humaine a été plus particulièrement étudiée. On sait qu'il s'agit d'une protéine de 133 acides aminés portant, fixé sur le résidu thréonine en position 3, un tétrasaccharide (Conradt, H.S. et al (1986) Carbohydr. Res., 149, 443-450). Les lymphocytes-T matures la synthétisent d'abord sous la forme d'un précurseur de 153 acides aminés et la sécrètent après élimination par coupure au niveau du réticulum endoplasmique, du peptide-signal de 20 acides aminés, puis après glycosylation dans l'appareil de Golgi, sous la forme d'une protéine de 133 acides aminés - dite protéine mature glycosylée.

30 Les propriétés biologiques de l'interleukine-2 d'origine humaine la destinent à une utilisation en tant que principe actif de médicaments utiles pour le traitement de maladies telles que les cancers et certaines maladies infectieuses ou parasitaires. Pour cette utilisation il paraît préférable de disposer d'interleukine-2 sous une forme glycosylée : la chaîne latérale saccharidique paraît contribuer en effet à stabiliser la protéine et à en améliorer la tolérance lors de son administration aux patients.

35 L'obtention d'interleukine-2 à partir soit de lymphocytes périphériques sains (Knipf, E.M. et al (1984) Eur. J., Biochem., 143, 199-203), soit d'une lignée cellulaire lymphoblastoïde telle que la lignée Jurkat (Robb, R.J. et al (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 5990-5994) a été décrite.

Les méthodes mises en oeuvre se sont avérées peu adaptées en raison tant de difficultés liées à la culture de lymphocytes sains que de la nécessité d'une phase d'induction.

40 Consécutivement au clonage d'un ADN complémentaire codant pour l'interleukine-2 (Taniguchi, T. et al (1983) Nature, 302, 305-310) l'utilisation de micro-organismes rendus aptes à la production d'interleukine-2 grâce aux techniques de l'ingénierie génétique a été décrite. La demande de brevet EP-A-0089 062 montre la possibilité d'utiliser - outre la bactérie *Escherichia coli* incapable de glycosylation - les cellules de singe COS. La demande de brevet EP-A-0172619 présente l'utilisation de diverses autres cellules animales parmi lesquelles notamment des cellules d'ovaire de hamster chinois (cellules CHO).

45 Il est encore connu que pour permettre, à l'issue d'une transfection, la mise en évidence, au sein d'une population de cellules eucaryotes, des cellules qui ont effectivement intégré un vecteur particulier, il est utile que ledit vecteur porte une séquence d'ADN dont l'expression puisse conférer aux cellules transfectées un avantage sélectif.

50 Une séquence d'ADN particulièrement adaptée est une séquence codant pour la dihydrofolate réductase (enzyme ci-après désignée par l'abréviation dhfr) ; décrite par Subramani, et al ((1981) Mol. Cel. Biol., 854-864) pareille séquence, portée par un vecteur d'expression, permet, après transfection de cellules incapables de synthétiser sous une forme fonctionnelle de la dhfr (cellules DHFR-), la croissance sur un milieu déficient en hypoxanthine, en glycine et en thymidine, des seules cellules ayant effectivement incorporé le vecteur.

55 L'intérêt accordé à l'utilisation d'un vecteur portant, avec les moyens nécessaires à son expression, une séquence d'ADN codant pour la dhfr est accentué par le fait qu'elle peut être à l'origine, que la cellule eucaryote transfectée soit capable (cellules DHFR+) ou non (cellules DHFR-) de synthétiser sous une forme fonctionnelle la dhfr, d'un processus d'amplification conduisant à une obtention accrue d'une protéine d'intérêt codée par une séquence d'ADN portée, avec les moyens nécessaires à son expression, par ledit vecteur. Le mécanisme de cette amplification reste à préciser. On sait que la dhfr est inhibée par le composé connu sous l'appellation méthotrexate (acide N-(((diamino-2,4 ptéridinyl-6) méthyl) méthylamino)-4 benzoyl) L-glutamique) et que la présence de méthotrexate dans un milieu de culture sélectif entraîne la mort de la plupart des cellules et que seules subsistent des cellules devenues capables de synthétiser des quantités importantes de dhfr. Et il a été constaté (Kaufman, R.J. et al (1982) J. Mol. Biol., 159, 601-621), chez des cellules ayant incorporé un vecteur portant, avec les moyens nécessaires à leur expression, une séquence

d'ADN codant pour la dhfr et une séquence d'ADN codant pour une autre protéine, que cette production amplifiée de dhfr était accompagnée d'une production amplifiée de ladite protéine.

La demanderesse, ayant construit des vecteurs portant simultanément, avec les moyens nécessaires à leur expression, une séquence d'ADN codant pour un précurseur naturel d'une interleukine-2 et une séquence d'ADN codant pour la dhfr, a constaté lors de la culture de cellules eucaryotes (et notamment de cellules CHO) ayant incorporé l'un des vecteurs concernés, que de tels vecteurs ne permettaient, en conditions d'expression transitoire, c'est-à-dire avant sélection d'une lignée hautement productrice par culture dans des milieux successifs présentant l'un par rapport au précédent une concentration accrue en méthotrexate, le recueil à partir du milieu de culture que de quantités d'interleukine-2 inférieures à celles recueillies à partir du milieu de culture des cellules de même nature ayant incorporé un vecteur ne différant que par l'absence de la séquence d'ADN codant pour la dhfr et des moyens nécessaires à l'expression de cette séquence.

Ces résultats, bien qu'encourageants par rapport aux quantités d'interleukine-2 pouvant être obtenues après culture de lymphocytes périphériques sains ou de cellules lymphoblastoïdes, montraient que, contrairement à ce qu'il avait pu être constaté avec d'autres protéines telles que l'antigène de surface du virus de l'hépatite B ou l'hormone de croissance humaine, il n'était pas possible pour l'obtention d'interleukine-2 de tirer tout l'intérêt attendu de l'utilisation d'une séquence d'ADN codant pour la dhfr, accompagnée des moyens nécessaires à son expression.

Poursuivant ses investigations la demanderesse a constaté que, de façon très surprenante, le remplacement, sur les premiers vecteurs testés, au niveau de la séquence d'ADN codant pour le précurseur de l'interleukine-2 de la partie codant pour son peptide-signal par une séquence codant pour le peptide-signal de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine (protéine ci-après désignée par l'abréviation hGH), permettait d'améliorer de manière significative le niveau de sécrétion et même, avec certaines constructions, de retrouver le niveau initial attendu. La demanderesse apporte ainsi une solution qui, satisfaisant aux critères qui lui sont afférents, permet d'envisager une production à l'échelle industrielle de l'interleukine-2.

Selon un premier aspect, l'invention concerne précisément des cellules eucaryotes recombinées productrices d'interleukine-2 qui contiennent, avec les moyens nécessaires à leur expression, une séquence d'ADN codant pour la dihydrofolate réductase et une séquence d'ADN codant pour un précurseur hybride de l'interleukine-2 dont le peptide-signal est celui de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine.

Elle a également pour objet un procédé d'obtention desdites cellules consistant 1) à transfecter des cellules eucaryotes à l'aide d'un vecteur portant à la fois, avec les moyens nécessaires à leur expression, une séquence d'ADN codant pour la dihydrofolate réductase et une séquence d'ADN codant pour un précurseur hybride de l'interleukine-2 dont le peptide-signal est celui de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine, puis 2) à sélectionner les cellules transfectées productrices d'interleukine-2 par culture dans des milieux successifs présentant l'un par rapport au précédent une concentration accrue en méthotrexate.

Enfin, elle a pour objet le procédé d'obtention d'interleukine-2 consistant à mettre en culture des cellules eucaryotes productrices d'interleukine-2, à recueillir le milieu de culture et à séparer l'interleukine-2 des autres constituants dudit milieu, procédé dans lequel les cellules mises en culture sont issues de cellules eucaryotes transfectées à l'aide d'un vecteur portant à la fois, avec les moyens nécessaires à leur expression, une séquence d'ADN codant pour la dihydrofolate réductase et une séquence d'ADN codant pour un précurseur hybride de l'interleukine-2 dont le peptide-signal est celui de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine, puis sélectionnées par culture dans des milieux successifs présentant l'un par rapport au précédent une concentration accrue en méthotrexate.

Il doit être précisé que ledit procédé peut s'appliquer, non seulement et de manière particulièrement adaptée à l'obtention d'interleukine-2 d'origine humaine, mais également à l'obtention d'interleukine-2 d'autres origines animales, dans la mesure où de telles molécules pourraient présenter un intérêt particulier justifiant une application industrielle, par exemple en qualité d'agent de diagnostic ou de principe actif d'un médicament notamment à usage vétérinaire.

Il va de soi que ce procédé est destiné principalement à permettre l'obtention d'interleukine-2 glycosylée telle qu'elle est sécrétée par les lymphocytes-T naturellement producteurs. Il doit être noté que ce procédé convient également à l'obtention des formes incomplètement glycosylées ou non glycosylées de l'interleukine-2 présentes dans le milieu après culture des cellules eucaryotes selon l'invention.

Les cellules eucaryotes utiles pour la mise en oeuvre de l'invention sont des cellules d'origine animale capables de glycosylation. Parmi ces cellules, les cellules communément désignées par l'appellation CHO par référence à leur origine (cellules d'ovaire de hamster chinois) sont particulièrement adaptées.

Les techniques liées à l'utilisation de ces cellules, qu'il s'agisse de leur propagation ou de leur transfection par les vecteurs ou encore de la sélection des cellules effectivement transfectées, sont connues de l'homme de l'art. Certaines seront plus précisément décrites lors de la présentation des exemples.

Les vecteurs nécessaires pour la mise en oeuvre de l'invention peuvent revêtir diverses formes. Il peut s'agir de tout ou partie d'un génome viral et notamment du génome d'un rétrovirus ou d'un plasmide ou encore d'un cosmide. De façon avantageuse, un plasmide est mis en oeuvre.

Les vecteurs selon l'invention portent avec les moyens nécessaires à leur expression une séquence d'ADN codant pour la dihydrofolate réductase et une séquence d'ADN codant pour un précurseur hybride de

l'interleukine-2 (précurseur ci-après symboliquement désigné par la notation : (ps-hGH)-interleukine-2) dont le peptide-signal est celui de l'un des précurseurs naturels de l'hGH.

La partie codante correspondant au peptide-signal peut avoir l'une des séquences que permet la dégénérescence du code génétique : un même acide aminé - hormis la méthionine - pouvant être codé par 2,3,4, ou même, pour certains, 6 codons. Une séquence de nucléotides préférée codant pour le peptide-signal ps-hGH est celle présentée à la figure 11 où a été noté, pour chacun des 26 codons, l'acide aminé lui correspondant.

Lesdites séquences d'ADN peuvent être incluses dans une même unité d'expression. D'une manière avantageuse chacune appartient à une unité d'expression autonome. Les moyens nécessaires à l'expression de ces séquences sont choisis parmi ceux généralement utilisés pour la construction de vecteurs destinés à la transfection de cellules eucaryotes. D'une manière préférée, ils sont issus du génome du virus SV 40 à partir duquel peuvent notamment être préparées des séquences d'ADN incluant en particulier le promoteur précoce, et/ou le signal précoce de polyadénylation (Fiers, W. (1978) Nature, 273, 113-120).

La construction des vecteurs selon l'invention fait appel à des techniques maintenant bien connues de l'homme de l'art.

Il doit être noté qu'en ce qui concerne la séquence d'ADN codant pour le précurseur (ps-hGH)-interleukine-2, il est intéressant de préparer un ADN complémentaire (en se référant par exemple aux travaux de Taniguchi, T. et al ((1983) Nature, 302, 305-310) ou encore à ceux de Devos, X. et al ((1983) Nucleic Acids Res., 11, 4307-4323) de l'ARN messager de lymphocytes-T codant pour le précurseur naturel de l'interleukine-2 puis de substituer à la séquence codant pour son peptide-signal une séquence codant pour le peptide-signal de l'un des précurseurs naturels de l'hGH.

Deux vecteurs préférés, construits en vue de l'obtention de l'interleukine-2 d'origine humaine sont les plasmides pSV 726 (figure 6) et pSV 741 (figure 9). Ils comportent chacun une unité d'expression pour la dhfr et une unité d'expression pour un précurseur (ps-hGH)-interleukine-2. Les deux plasmides diffèrent principalement par la présence, la nature et la position d'introns dans les unités d'expression. Plus précisément le plasmide pSV 726 porte un intron en aval de la séquence codant pour le précurseur (ps-hGH)-interleukine-2 ainsi qu'un intron en aval de la séquence codant pour la dhfr. Le plasmide pSV 741 porte par contre un intron en amont de la séquence codant pour le précurseur (ps-hGH)-interleukine-2 et ne présente aucun intron au niveau de son unité d'expression pour la dhfr.

Selon encore un autre aspect, l'invention concerne des lignées cellulaires sélectionnées, à partir des cellules eucaryotes ayant incorporé un vecteur selon l'invention, par culture desdites cellules dans des milieux successifs, présentant l'un par rapport au précédent une concentration accrue en méthotrexate. On poursuit les passages d'un milieu à l'autre jusqu'à ce que l'on ne constate plus une amplification de la sécrétion d'IL-2.

Des exemples de mise en oeuvre de l'invention sont présentés ci-après. Ils ne sont donnés bien entendu qu'à titre d'illustrations et ne sont en aucun cas limitatifs.

EXEMPLES

Sont présentés ci-après à titre d'exemples deux vecteurs selon l'invention testés en conditions d'expression transitoire. L'obtention de lignées cellulaires hautement productrices puis la caractérisation de l'interleukine-2 d'origine humaine (ci-après désignée par l'abréviation IL-2) produite sont ensuite décrites.

I. CONSTRUCTION ET TEST EN CONDITIONS D'EXPRESSION TRANSITOIRE DE DEUX VECTEURS: LES PLASMIDES PSV 726 ET PSV 741

1. METHODES

A/ CONSTRUCTION DES VECTEURS

La construction des vecteurs comprend notamment l'isolement de fragments d'ADN à l'aide d'enzymes de restriction à partir de vecteurs préexistants, la synthèse par voie chimique d'oligonucléotides, l'assemblage - éventuellement après modification de leurs extrémités - de ces divers fragments en utilisant une enzyme telle que l'ADN - ligase du bactériophage T4, la sélection par clonage - après transformation bactérienne dans *Escherichia coli* - des vecteurs puis leur purification.

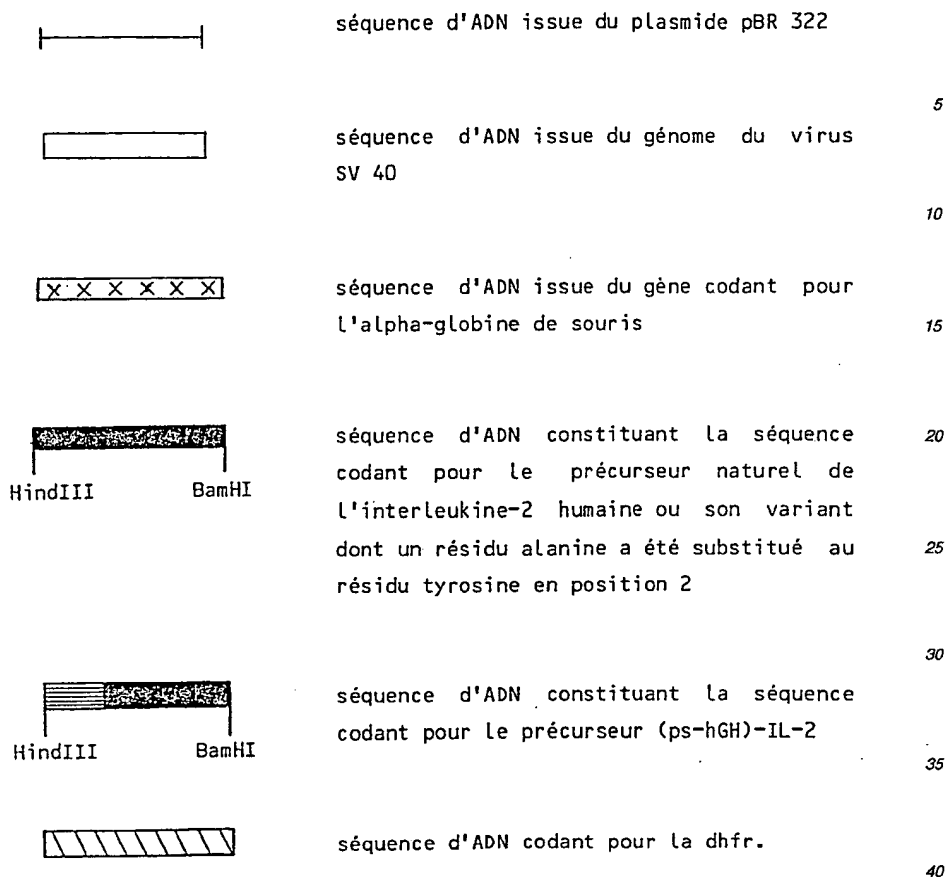
Elle fait appel à des techniques bien connues de l'homme de l'art.

Ces techniques sont décrites dans l'ouvrage intitulé Molecular Cloning : a Laboratory Manual de Maniatis, T; et al publié en 1982 par les Editions Cold Spring Harbor Press à New York (E.U.A.).

L'ensemble des enzymes de restriction nécessaires à la construction des vecteurs ci-après présentés est commercialisé notamment par la Société New England Biolabs (E.U.A.).

L'ADN-ligase du bactériophage T4 est disponible auprès de la Société New England Nuclear (E.U.A.).

La construction des vecteurs est explicitée à l'aide des figures 2 à 10 pour lesquelles la légende suivante a été adoptée :



B/ OBTENTION D'UNE SEQUENCE D'ADN CODANT POUR LE PRECURSEUR NATUREL DE L'INTERLEUKINE-2 D'ORIGINE HUMAINE

Un ADN complémentaire à l'ARN messager codant pour le précurseur de l'IL-2 isolé à partir de lymphocytes-T humains a été cloné.

La séquence nucléotidique, ainsi obtenue, les nucléotides étant regroupés par codons à la hauteur desquels on a porté les acides aminés du précurseur leur correspondant, est incluse dans la séquence d'ADN (brin 5'→3') présentée à la figure 1.

C/ MISE EN OEUVRE DES CELLULES EUCARYOTES

a. Choix.

Le choix s'est porté sur la souche DXB11 de cellules CHO DHFR- sélectionnée par Urlaub, G. et Chasin, L. ((1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220).

b. Mode opératoire pour l'expression transitoire.

Le protocole décrit par Sompayrac, L. et Danna, K. ((1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7575) a été mis en oeuvre.

Pour chaque essai : $5 \cdot 10^5$ cellules sontensemencées dans une boîte de Petri de 6 cm de diamètre contenant 5 ml de milieu alpha-MEM (Gibco, E.U.A.) additionné à raison de 5 % (v/v) de sérum foetal de veau (Gibco).

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les cellules sont lavées avec 5 ml de tampon PBS (R. Dulbecco et M.

Vogt, J. Exp. Med. 99 (1954) 167) puis recouvertes de 1 ml de milieu alpha-MEM additionné de 0,05 M de tris (hydroxyméthyl) aminométhane - HCl (ou tris-HCl) à pH 7,3, de 0,2 mg de DEAE dextran de 500 000 daltons (Sigma, E.U.A.) et de 10 µg d'ADN plasmidique.

Et on procède à une incubation de 7 h à 37°C à l'issue de laquelle les cellules sont lavées avec 5 ml de tampon PBS puis recouvertes de 5 ml de milieu alpha-MEM additionné, à raison de 2 % (v/v) de sérum foetal de veau.

Les cellules sont alors placées en incubation à 37°C pendant 4 jours. Le milieu de culture est ensuite recueilli et sert à une mesure de l'activité de type IL-2.

10 D/ MESURE DE L'ACTIVITE DE TYPE IL-2

On mesure l'activité biologique des milieux de culture recueillis tels qu'au paragraphe C/b - selon le test colorimétrique de Mosmann, T. (1983) J. Immunol. Methods, 65, 55-63) - sur la prolifération de la lignée de lymphocytes-T de souris IL-2- dépendante CTLL-2 (Baker, P. et al (1979) J. Exp. Med., 149, 173). A titre de témoin, la préparation de référence décrite dans Lymphokine Research ((1984), 4, 193-227) est utilisée.

15 2. PLASMIDE PSV 726

A/ CONSTRUCTION

La construction du plasmide pSV 726 a pour point de départ le plasmide pSV 700 (figure 2).

20 Le plasmide pSV 700 résulte de l'assemblage de 5 fragments d'ADN :

- Un fragment PvuII - HindIII de 342 paires de bases (ci-après pb) issu du génome du virus SV 40 (Fiers, W. (1978) Nature, 273, 113-120), et contenant le promoteur précoce de ce virus.

- Un fragment HindIII - BamHI de 504 pb (figure 1) contenant une séquence d'ADN codant pour le précurseur naturel de l'IL-2 tel que synthétisé dans les lymphocytes humains.

25 - Un fragment BamHI - BclI de 305 pb issu du gène de l'alpha-globine de souris (Nishioka, Y. et Leder, P. (1979) Cell, 18, 875-882), et qui contient l'intron distal de ce gène.

- Un fragment HpaI - BamHI de 133 pb issu du génome du virus SV 40 et contenant le signal précoce de polyadénylation de ce virus.

- Un fragment BamHI - PvuII de 2672 pb issu du plasmide pBR 322 (Bolivar, F. (1977) Gene, 2, 95-113).

30 La séquence de nucléotides AGCTTCCACAATGTACAGG située à l'extrémité 5' du brin codant du fragment HindIII - BamHI (figure 1) est ensuite remplacée par la séquence synthétique AGCTTCCACCATGGCTAGG de manière à disposer, au niveau des nucléotides encadrant le codon ATG, d'une séquence conforme à la séquence consensus CCACCATGG décrite par Kozak, M. ((1984) Nucleic Acids Res., 12, 857-872). Le plasmide pSV 703 est ainsi obtenu (figure 3).

35 Le segment d'ADN compris entre les sites de restriction HindIII et HgiAI situé dans la partie amont du segment HindIII - BamHI (dont le brin 5' → 3' est représenté sur la figure 12) du plasmide pSV 703 et contenant la séquence correspondant au peptide-signal modifié (il comporte un résidu alanine en position 2 au lieu du résidu tyrosine en raison de l'adoption d'une séquence conforme à la séquence consensus de Kozak) du précurseur naturel de l'IL-2 et au premier acide aminé de l'IL-2 mature, est ensuite remplacé par un oligonucléotide double-brin synthétique dont le brin codant 5' → 3' est représenté à la figure 11.

40 Cette séquence synthétique code à partir de son neuvième nucléotide pour le peptide-signal de l'un des précurseurs naturels de l'hGH (la séquence en acides aminés de ce peptide-signal est portée sur la figure 11, chaque acide aminé étant en regard du codon lui correspondant), ci-après noté peptide-signal de l'hGH, et pour le premier acide aminé de l'IL-2 mature.

45 Le plasmide obtenu est le plasmide pSV 706 (figure 4). Son segment HindIII-BamHI qui porte la séquence codant pour le précurseur (ps-hGH)-IL-2, est représenté sur la figure 13.

Enfin, le fragment compris entre les sites de restriction EcoRI et EcoRV de 185 pb du plasmide pSV 706 est remplacé par un fragment PvuII-EcoRI de 2677 pb issu du plasmide pSV2-dhfr (Subramani, S. et al (1981) Molecular and Cellular Biology, 1, 854-864) déposé à la collection ATCC sous la référence 37146. Le plasmide obtenu est le plasmide pSV 726 (figure 6).

50 Le plasmide pSV 726 contient :

- Une unité d'expression pour le précurseur (ps-hGH)-IL-2. Cette unité a pour promoteur le promoteur précoce du virus SV 40 ; elle comporte, en aval de la séquence codant pour le précurseur de (ps-hGH)-IL-2, une séquence qui contient le deuxième intron du gène de l'alpha-globine de souris puis le signal précoce de polyadénylation du virus SV 40.

55 - Une unité d'expression pour la dhfr. Cette unité a pour promoteur le promoteur précoce du virus SV 40 ; elle comporte, en aval de la séquence codant pour la dhfr, la séquence comprise entre les sites MboI en positions 4693 et 4083 - selon la notation de Fiers, W. - sur le génome du virus SV 40 et contenant un intron pour l'antigène t du virus SV 40 puis le signal précoce de polyadénylation du virus SV 40. Cette unité est contenue
60 dans le fragment PvuII-EcoRI issu du plasmide pSV2-dhfr.

B/ AVANTAGES LIES A L'UTILISATION DU PLASMIDE PSV 726

Un essai comparatif a été réalisé.

65 Les plasmides pSV 703, pSV 720 (présenté ci-après) et pSV 726 ont été testés dans des conditions d'expression transitoire (cf méthodes). On a mesuré l'activité (selon le protocole indiqué plus haut) de type

IL-2 de chaque surnageant de culture de manière à apprécier le niveau de sécrétion de l'IL-2 dont sont capables les cellules transfectées avec chacun des plasmides.

Le plasmide pSV 720 (figure 5) est un dérivé du plasmide pSV 703. Il a été obtenu en substituant au fragment compris entre les sites de restriction EcoRI et EcoRV de 185 pb du plasmide pSV 703 un fragment PvuII - EcoRI de 2677 pb issu du plasmide pSV2 - dhfr.

Les plasmides pSV 720 et pSV 726 portent de ce fait la même unité d'expression pour la dhfr. Ils ne diffèrent que par leur séquence d'ADN respective codant pour le peptide-signal du précurseur de l'IL-2.

Cette séquence code dans le cas du plasmide pSV 720, pour une variante du peptide-signal du précurseur naturel de l'IL-2 et dans le cas du plasmide pSV 726 pour le peptide-signal de l'hGH.

Le tableau 1 ci-après présente les résultats de cet essai:

TABLEAU 1

PLASMIDE	ACTIVITE IL-2 (U/ml)
pSV 703	228 ± 112
pSV 720	34 ± 29
pSV 726	153 ± 68

Ce tableau montre la chute de sécrétion - en conditions d'expression transitoire - liée à l'introduction dans un plasmide (pSV 703) d'une unité d'expression pour la dhfr (plasmide pSV 720). Il indique de manière nette que la substitution à la séquence codant pour le variant du peptide-signal du précurseur naturel de l'IL-2 de la séquence codant pour le peptide-signal de l'hGH (plasmide pSV 726) permet d'améliorer de manière significative le niveau de sécrétion et même de retrouver un niveau sensiblement équivalent à celui déterminé pour le plasmide d'origine (plasmide pSV 703).

3. PLASMIDE PSV 741

A/ CONSTRUCTION

La construction du plasmide pSV 741 a pour point de départ le plasmide pSV 739 (figure 7).

Le plasmide pSV 739 résulte de l'assemblage de 5 fragments d'ADN :

- Un fragment EcoRV-BglII de 777 pb issu du génome du virus SV 40 et contenant une partie du promoteur précoce du virus SV 40.

- un fragment BglII-PstI de 239 pb issu du plasmide pI1 (Okayama, H. et Berg, P. (1983) Molecular and Cellular Biology, 3, 280-289) et contenant la partie manquante dans le fragment EcoRV-BglII du promoteur précoce du virus SV 40 et les 2 introns de l'ARN messager tardif 19 S de la protéine VP2 et de l'ARN messager tardif 16 S de la protéine VP1 (Fiers, W. (1978) Nature 273, 113-120).

- Un fragment PstI-BamHI de 525 pb constitué du fragment HindIII-BamHI de 521 pb du plasmide pSV 706 (cf figure 13) allongé d'un linker PstI-HindIII ; ce fragment contient la séquence d'ADN codant pour le précurseur (ps-hGH)-IL-2.

- Un fragment BclI-EcoRI de 988 pb issu du génome du virus SV 40 et contenant le signal précoce de polyadénylation de ce virus.

- Un fragment EcoRI-PvuII de 2295 pb issu du plasmide pBR 322.

Le plasmide pSV 741 (figure 9) est obtenu en substituant au fragment BamHI-EcoRI du plasmide pSV 739 un fragment PvuII-EcoRI résultant lui-même de l'assemblage d'un fragment BclI-EcoRI de 988 pb issu du génome du virus SV 40 et contenant le signal précoce de polyadénylation de ce virus et d'un fragment PvuII-BglII de 1103 pb issu du plasmide pSV2-dhfr.

Le plasmide pSV 741 contient :

- Une unité d'expression pour le précurseur (ps-hGH)-IL-2. Cette unité a pour promoteur le promoteur précoce du virus SV 40. Elle comporte, en amont de la séquence codant pour le précurseur de l'IL-2, une séquence constituée de deux introns du virus SV 40 et, en aval de cette séquence, le signal précoce de polyadénylation du virus SV 40.

- Une unité d'expression pour la dhfr. Cette unité comporte le promoteur précoce du virus SV 40, une séquence d'ADN codant pour la dhfr et, en aval de cette séquence, sans intron intermédiaire, le signal précoce de polyadénylation du virus SV 40.

B/ AVANTAGES LIES A L'UTILISATION DU PLASMIDE PSV 741

Un essai comparatif a été réalisé.

Les plasmides pSV 739, pSV 741 et pSV 742 (cf ci-après) ont été testés dans des conditions d'expression transitoire (cf méthodes).

On a mesuré (selon le protocole indiqué plus haut) l'activité de type IL-2 de chaque milieu de culture de manière à apprécier le niveau de sécrétion de l'IL-2 dont sont capables les cellules transfectées avec chacun des plasmides.

Le plasmide pSV 742 (figure 10) a été construit à partir du plasmide pSV 739.

On a remplacé le fragment HindIII-XbaI de 260 pb du plasmide PSV 739 (figure 13) par le fragment

HindIII-XbaI de 244 pb (figure 12) du plasmide pSV 703 (figure 3). Le plasmide obtenu est le plasmide pSV 740 (figure 8).

Le plasmide pSV 742 a été obtenu en substituant au fragment EcoRI-BamHI du plasmide pSV 740 un fragment PvuII-EcoRI résultant lui-même de l'assemblage d'un fragment BglII-PvuII de 1103 pb issu du plasmide pSV2-dhfr et d'un fragment EcoRI-BclI de 988 pb issu du génome du virus SV 40 et contenant le signal précoce de polyadénylation de ce virus.

Les plasmides pSV 741 et pSV 742 portent de ce fait la même unité d'expression pour la dhfr. Ils ne diffèrent que par la composition de leur séquence d'ADN respective codant pour le peptide-signal du précurseur de l'IL-2. Cette séquence code dans le cas du plasmide pSV 742 pour une variante du peptide-signal du précurseur naturel de l'IL-2 et dans le cas du plasmide pSV 741 pour le peptide-signal de l'hGH.

Le tableau 2 ci-après présente les résultats de cet essai :

TABLEAU 2

PLASMIDE	ACTIVITE IL-2 (U/ml)
pSV 740	171 \pm 10
pSV 741	46 \pm 4
pSV 742	7 \pm 2

Ce tableau montre la chute de sécrétion - en conditions d'expression transitoire - liée à l'introduction dans le plasmide pSV 740 d'une unité d'expression pour la dhfr (plasmide pSV 742). Il indique de manière nette que la substitution de la séquence codant pour un variant du peptide-signal du précurseur naturel de l'IL-2 par une séquence codant pour le peptide-signal de l'hGH (plasmide pSV 741) permet d'améliorer de manière significative le niveau de sécrétion d'IL-2.

II. OBTENTION DE LIGNEES CELLULAIRES HAUTEMENT PRODUCTRICES.

Des cellules CHO DHFR- de la souche DXB11 ont été transfectées avec l'un ou l'autre des plasmides pSV 726 et pSV 741.

Le mode opératoire décrit par Graham, F. et Van der Eb, A. ((1973) Virology, 54, 536-539) a été suivi.

Les cellules sont tout d'abord propagées dans du milieu alpha-MEM (Gibco) additionné, à raison de 10 % (v/v) de sérum foetal de veau, de 20 μ g/ml de gentamycine, de 60 μ g/ml de tylocine et de 300 μ g/ml de L-glutamine (ci-après milieu non sélectif).

Après une phase de lavage, les cellules ensemencées la veille - à raison de $0,8 \cdot 10^6$ pour une boîte de Petri de 10 cm de diamètre - sont recouvertes de milieu non sélectif et l'on ajoute 10 μ g de l'un des plasmides en présence de phosphate de calcium mais sans ADN de sperme de saumon. Des cellules ainsi préparées sont incubées 7 heures à 37°C.

Les cellules sont ensuite cultivées dans du milieu alpha-MEM additionné, à raison de 5 % (v/v), de sérum foetal de veau pendant 3 jours à 37°C. A l'issue de cette incubation, elles sont réparties à raison de $5 \cdot 10^5$ cellules par boîte, dans des boîtes de Petri contenant du milieu qui, constitué de milieu essentiel minimum contenant en outre des sels, est commercialisé par la Société Gibco sous la référence 041-1095 ; ce milieu est ici utilisé additionné de sérum foetal de veau dialysé Gibco (10 % v/v), de gentamycine (20 μ g/ml), de tylocine (50 μ g/ml), de L-glutamine (300 μ g/ml) et de L-proline (150 μ g/ml). Ce milieu ainsi complété constitue le milieu sélectif cité ci-après.

Les cellules ainsi préparées sont incubées à 37°C pendant 2 semaines en renouvelant le milieu sélectif tous les 3 jours. Les colonies observées à l'issue de cette incubation sont en principe issues de cellules ayant effectivement incorporé un plasmide. Ces colonies sont prélevées et remises en culture séparément dans du milieu sélectif et testées par une mesure de l'activité de type IL-2 pour s'assurer de leur aptitude à produire de l'IL-2.

C'est ainsi qu'après transfection ont pu être isolées et se sont révélées positives 347 colonies avec le plasmide pSV 726.

Les colonies les plus productrices (35 000 à 50 000 unités d'IL-2/ml mesurées au bout de 4 jours, en partant d'une population initiale de $4 \cdot 10^5$ cellules) ont été mises en culture. Les cellules ont été repiquées successivement dans 4 préparations de milieu sélectif présentant l'une par rapport à la précédente une concentration accrue (0,02, 0,05, 0,1 puis 0,2 μ M) en méthotrexate (amethopterin, Sigma) de la manière décrite par Alt. F. et al ((1978) Journal of Biological Chemistry, 253, 1357-1570).

A l'issue de cette phase opératoire, plusieurs lignées hautement productrices ont pu être sélectionnées.

C'est ainsi que la lignée 109.12 transfectée avec le plasmide pSV 726 est capable d'un niveau de sécrétion d'IL-2, après 4 jours de culture, exprimé en terme d'activité, de 250 000 unités/ml.

III. CARACTERISATION DE L'IL-2 SECRETEE PAR LES LIGNEES

La mise en culture à plus grande échelle des lignées hautement productrices décrites au paragraphe II a permis de disposer, par traitement des surnageants de culture, après séparation des autres constituants, de la protéine sécrétée par les cellules en quantité suffisante pour en permettre la caractérisation.

1. PURIFICATION DE L'IL-2

L'IL-2 est purifiée à partir d'un litre de surnageant de culture.

On procède tout d'abord à une concentration et à une première purification en soumettant le surnageant à une chromatographie d'échange d'ions sur une colonne d'agarose Sepharose[®] (S - Fast Flow - Pharmacia Fine Chemical - Suède) préalablement équilibrée avec de l'acétate d'ammonium 0,05 M à pH 4,5. L'élution est réalisée à l'aide d'acétate d'ammonium 0,05 M (pH 5,5) additionné de NaCl de molarité 0,05 M puis 0,5 M.

Les fractions éluées, qui s'avèrent biologiquement actives d'après une mesure de leur activité de type IL-2, sont rassemblées et leur pool est soumis à une chromatographie liquide à haute pression sur une colonne de phases inversées. Le support choisi est un gel de silice greffée en C₃. La colonne a pour dimensions : 1,0 x 25,0 cm.

L'élution est réalisée, avec un gradient linéaire d'acétonitrile variant de 5 à 100 % (v/v) dans une solution dans l'eau à 0,1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique, en 80 min avec un débit de 4 ml/min.

Les fractions éluées, biologiquement actives, sont rassemblées et leur pool est soumis à une chromatographie de même type que celle ci-dessus réalisée, dans des conditions notamment d'élution identiques, sur un gel de silice greffée en C₁₈ dans une colonne de dimensions : 2,1 x 10,0 cm.

Le pool des fractions éluées recueillies lors de cette chromatographie, biologiquement actives, et présentant, d'après les résultats d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (Laemli, (1970) Nature, 277, 680-685), une pureté en IL-2 supérieure à 95 % constitue le matériel sur lequel est effectuée la caractérisation de l'IL-2.

2. CARACTERISATION DE L'IL-2 PAR DETERMINATION DE LA SEQUENCE AMINO-TERMINALE

Les échantillons à traiter sont portés à la surface d'un filtre de bromure d'hexadiméthrine (ou polybrene). Le filtre est introduit dans un séquenceur de protéines (modèle 470 A commercialisé par la Société Applied Biosystems (E.U.A.)) équipé d'un chromatographe (Modèle 130A - Applied Biosystems) qui analyse in fine les dérivés phénylthiohydantoïques formés.

Les résultats de cette détermination sont en accord avec la séquence déjà publiée pour le produit naturel (Robb, R. et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6486-6490).

Cette séquence s'écrit pour ses dix premiers acides aminés :

1 10
Ala-Pro-Thr-Ser-Ser-Ser-Thr-Lys-Lys-Thr

L'alanine est le seul résidu détecté en position N-terminale. Cela apporte la confirmation que le précurseur (ps-hGH)-IL-2 a été correctement coupé lors de la sécrétion.

En conclusion, ces exemples mettent bien en évidence l'intérêt de l'invention qui permet une utilisation probante pour la production d'interleukine-2 de cellules eucaryotes en mettant à profit les qualités propres au système de sélection et/ou d'amplification se fondant sur la transfection des cellules par un vecteur portant, avec les moyens nécessaires à son expression, une séquence codant pour la dihydrofolate-réductase.

Revendications

1. Cellules eucaryotes productrices d'interleukine-2, caractérisées en ce qu'elles contiennent, avec les moyens nécessaires à leur expression, une séquence d'ADN codant pour la dihydrofolate réductase et une séquence d'ADN codant pour un précurseur hybride de l'interleukine-2 dont le peptide-signal est celui de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine.

2. Cellules eucaryotes selon la revendication 1, caractérisées en ce que la séquence d'ADN codant pour le précurseur hybride est la séquence d'ADN codant pour l'interleukine-2 d'origine humaine dont le peptide-signal est celui de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine.

3. Cellules eucaryotes selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisées en ce qu'elles sont des cellules CHO.

4. Procédé d'obtention des cellules eucaryotes productrices d'interleukine-2 selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste à transférer des cellules eucaryotes à l'aide d'un vecteur portant à la fois, avec les moyens nécessaires à leur expression, une séquence d'ADN codant pour la dihydrofolate réductase et une séquence d'ADN codant pour un précurseur hybride de l'interleukine-2 dont le peptide-signal est celui de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine, puis à sélectionner ensuite les cellules transfectées productrices d'interleukine-2 par culture dans des milieux successifs présentant l'un par rapport au précédent une concentration accrue en méthotrexate.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que les cellules eucaryotes sont des cellules CHO.

6. Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé en ce que le vecteur porte une seule unité d'expression pour la dihydrofolate réductase et le précurseur de l'interleukine-2.

5 7. Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé en ce que le vecteur porte deux unités d'expression distinctes, l'une pour la dihydrofolate réductase et l'autre pour le précurseur de l'interleukine-2.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisé en ce que le précurseur hybride est la séquence d'ADN codant pour l'interleukine-2 d'origine humaine dont le peptide-signal est celui de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine.

10 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, caractérisé en ce que le vecteur a les caractéristiques de l'un des plasmides pSV 726 et pSV 741.

10. Vecteur d'expression caractérisé en ce qu'il porte, avec les moyens nécessaires à leur expression, une séquence d'ADN codant pour la dihydrofolate réductase et une séquence d'ADN codant pour un précurseur hybride de l'interleukine-2 dont le peptide-signal est celui de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine.

11. Vecteur selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il porte une seule unité d'expression pour la dihydrofolate réductase et le précurseur de l'interleukine-2.

12. Vecteur selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il porte deux unités d'expression distinctes, l'une pour la dihydrofolate réductase et l'autre pour le précurseur de l'interleukine-2.

20 13. Vecteur selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisé en ce qu'il a les caractéristiques de l'un des plasmides pSV 726 et pSV 741.

14. Procédé d'obtention d'interleukine-2 consistant à mettre en culture des cellules eucaryotes productrices d'interleukine-2, à recueillir le milieu de culture et à séparer des autres constituants l'interleukine-2 contenue dans ledit milieu, caractérisé en ce que les cellules mises en culture sont issues de cellules eucaryotes transfectées à l'aide d'un vecteur portant à la fois, avec les moyens nécessaires à leur expression, une séquence d'ADN codant pour la dihydrofolate réductase et une séquence d'ADN codant pour un précurseur hybride de l'interleukine-2 dont le peptide-signal est celui de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine, puis sélectionnées par culture dans des milieux successifs présentant l'un par rapport au précédent une concentration accrue en méthotrexate.

15. Interleukine-2 obtenue par le procédé selon la revendication 14.

FIG. 1

-20
 MET TYR ARG MET GLN LEU LEU SER CYS ILE ALA
 5' AGCTTCCACA ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT TGC ATT GCA
 -1 1
 LEU SER LEU ALA LEU VAL THR ASN SER ALA PRO THR SER SER SER
 CTA AGT CTT GCA CTT GTC ACA AAC AGT GCA CCT ACT TCA AGT TCT
 THR LYS LYS THR GLN LEU GLN LEU GLU HIS LEU LEU LEU ASP LEU
 ACA AAG AAA ACA CAG CTA CAA CTG GAG CAT TTA CTT CTG GAT TTA
 GLN MET ILE LEU ASN GLY ILE ASN ASN TYR LYS ASN PRO LYS LEU
 CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC
 THR ARG MET LEU THR PHE LYS PHE TYR MET PRO LYS LYS ALA THR
 ACC AGG ATG CTC ACA TTT AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA
 GLU LEU LYS HIS LEU GLN CYS LEU GLU GLU GLU LEU LYS PRO LEU
 GAA CTG AAA CAT CTT CAG TGT CTA GAA GAA GAA CTC AAA CCT CTG
 GLU GLU VAL LEU ASN LEU ALA GLN SER LYS ASN PHE HIS LEU ARG
 GAG GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC AAA AAC TTT CAC TTA AGA
 PRO ARG ASP LEU ILE SER ASN ILE ASN VAL ILE VAL LEU GLU LEU
 CCC AGG GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA ATA GTT CTG GAA CTA
 LYS GLY SER GLU THR THR PHE MET CYS GLU TYR ALA ASP GLU THR
 AAG GGA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA TAT GCT GAT GAG ACA
 ALA THR ILE VAL GLU PHE LEU ASN ARG TRP ILE THR PHE CYS GLN
 GCA ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC AGA TGG ATT ACC TTT TGT CAA
 133
 Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 AGC ATC ATC TCA ACA CTG ACT TGA TAATTAAGTGCTTCCCACTTAAACATATCAG 3'

FIG. 2

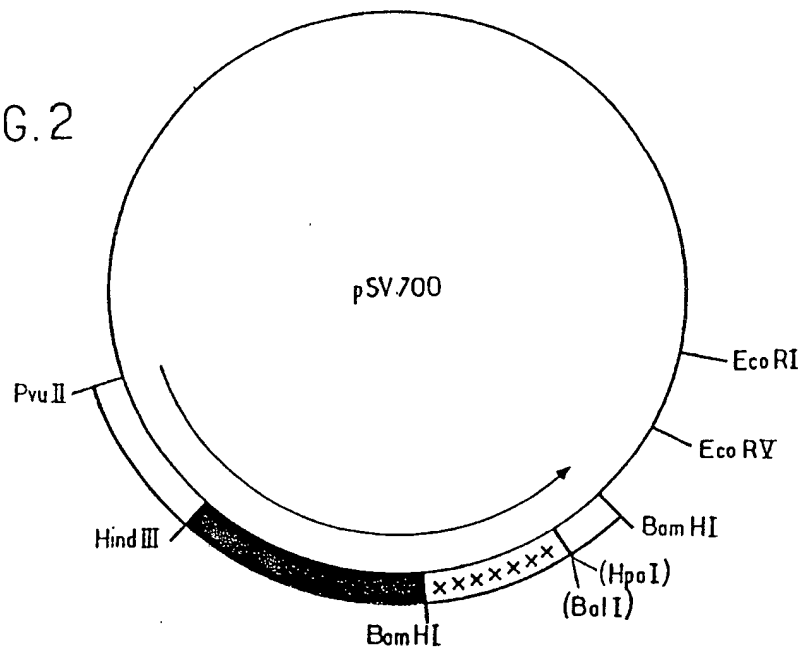


FIG.3

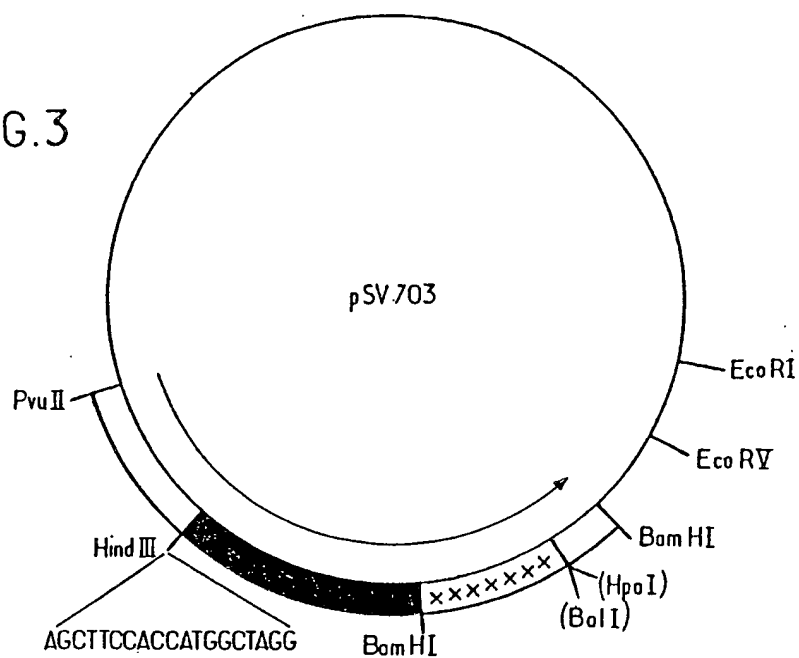
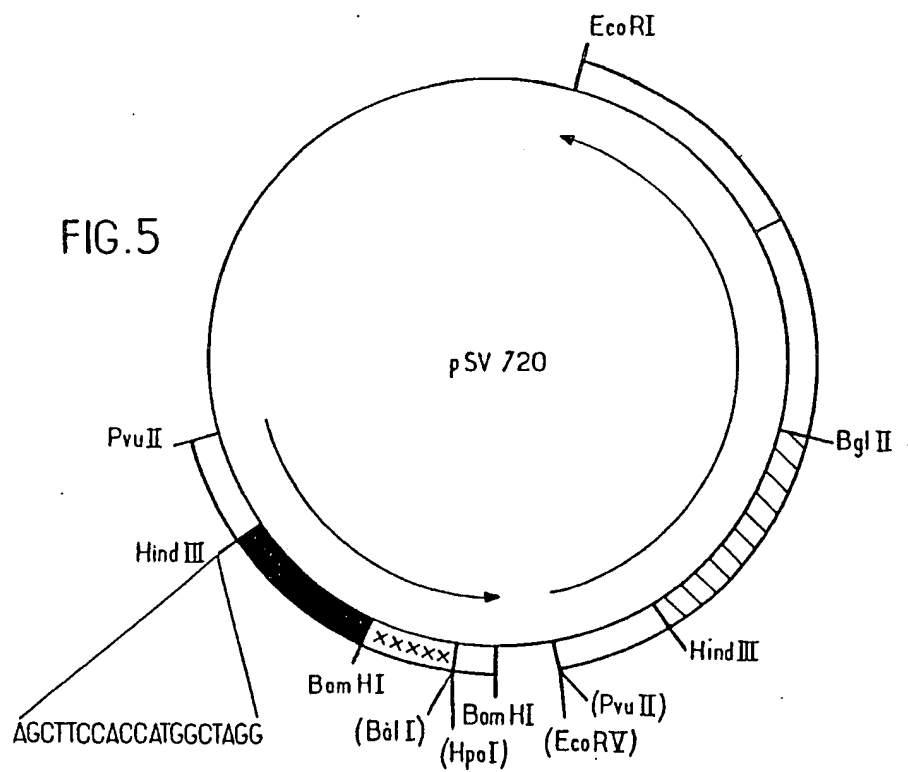


FIG.5



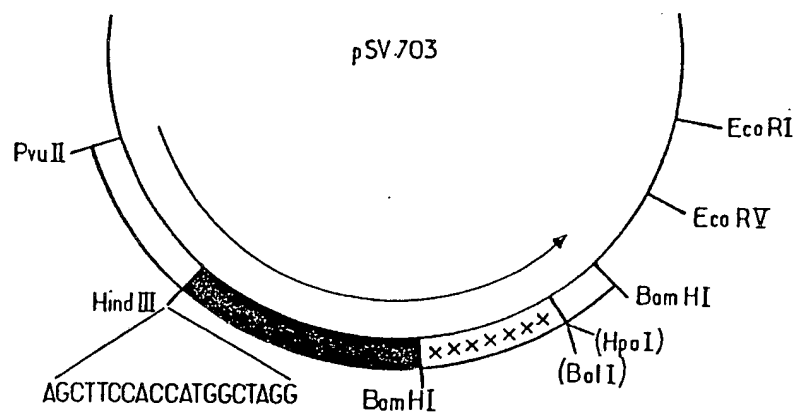


FIG.5

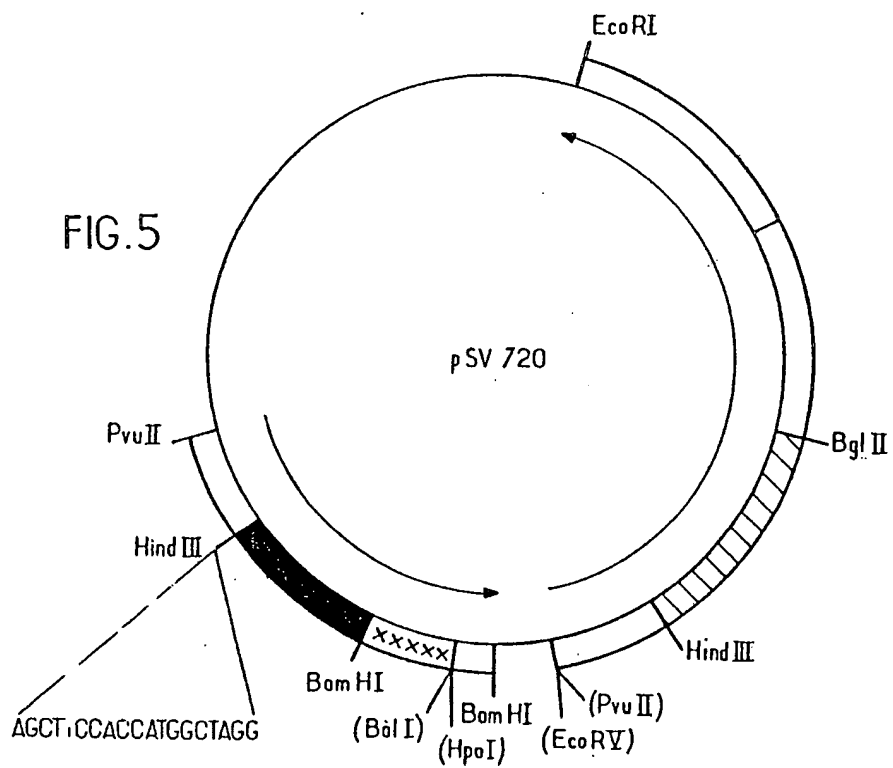


FIG. 4

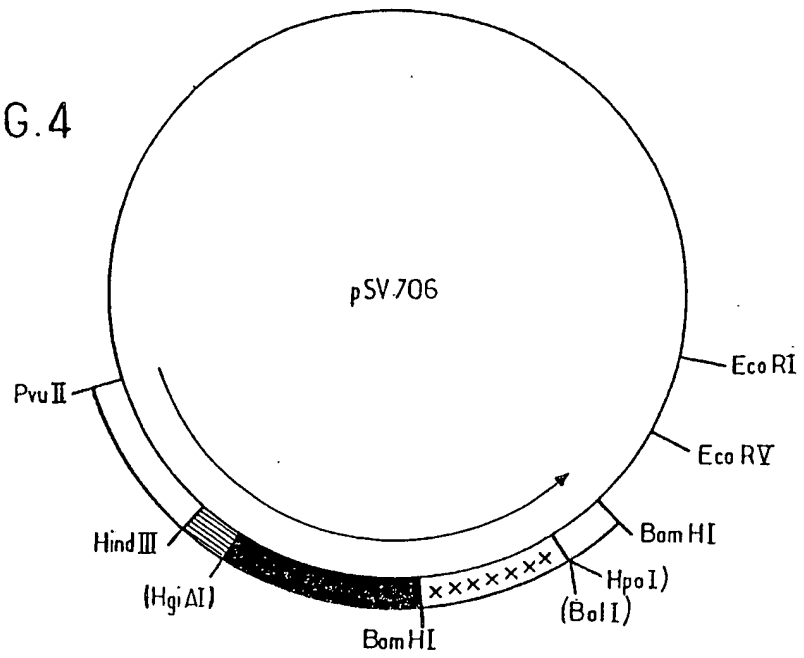


FIG. 6

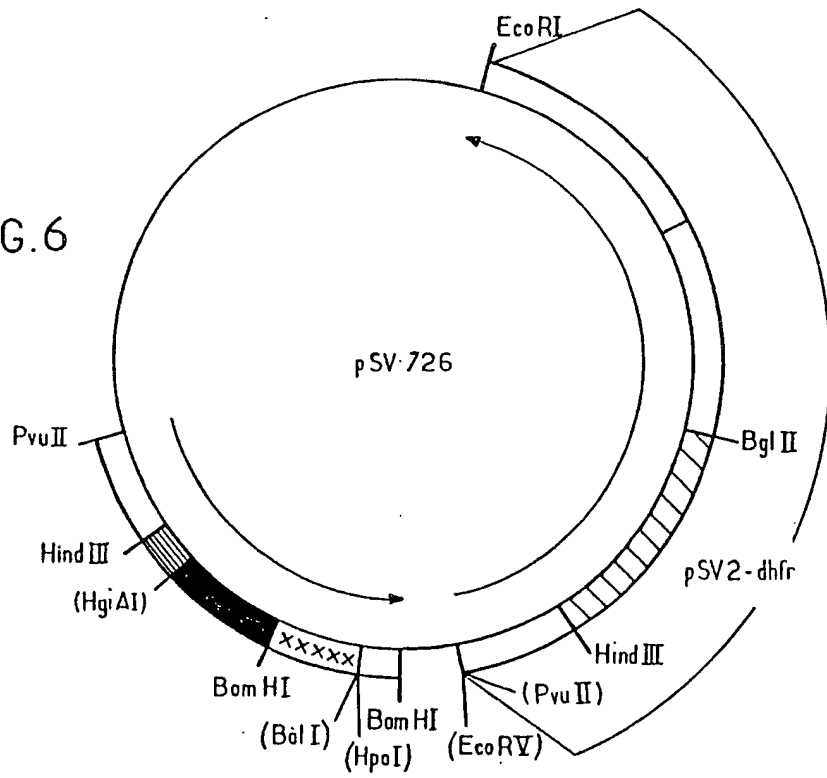


FIG. 7

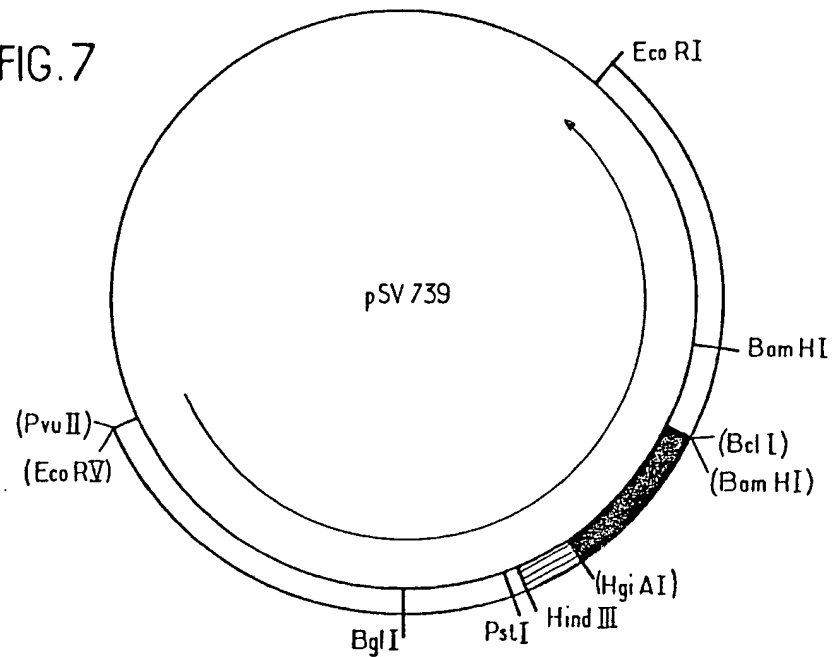


FIG. 9

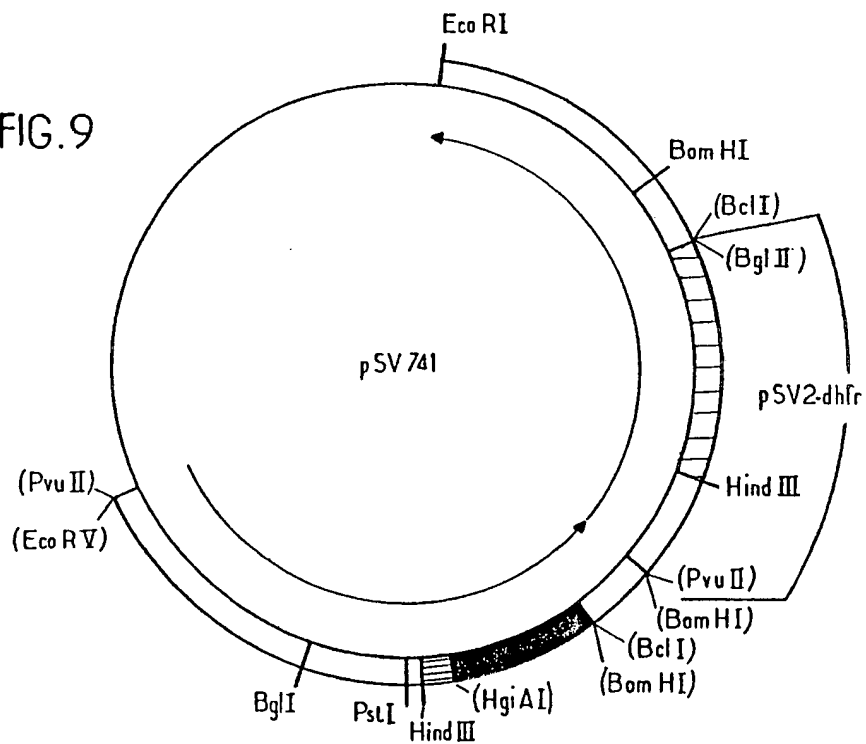


FIG. 8

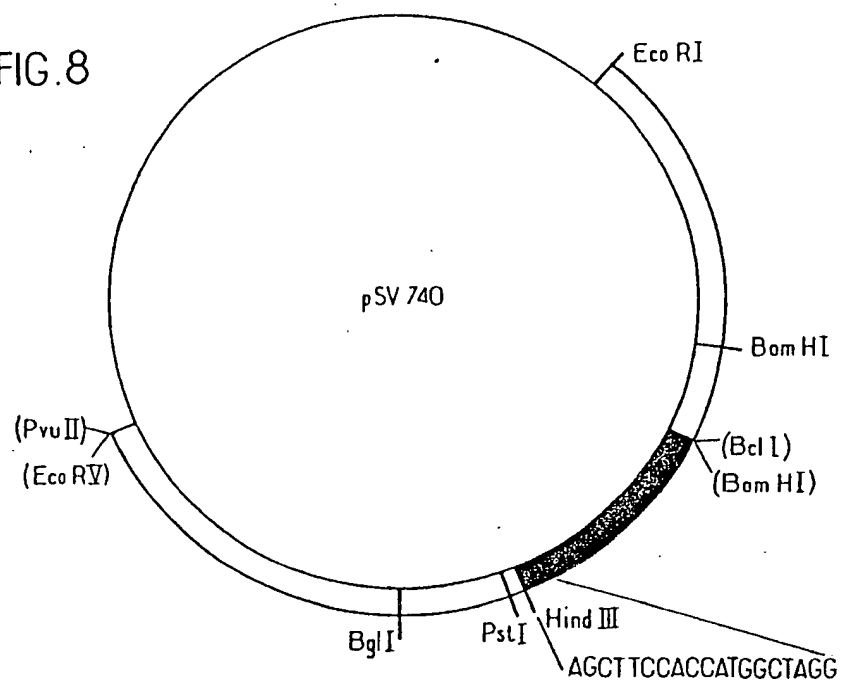


FIG. 10

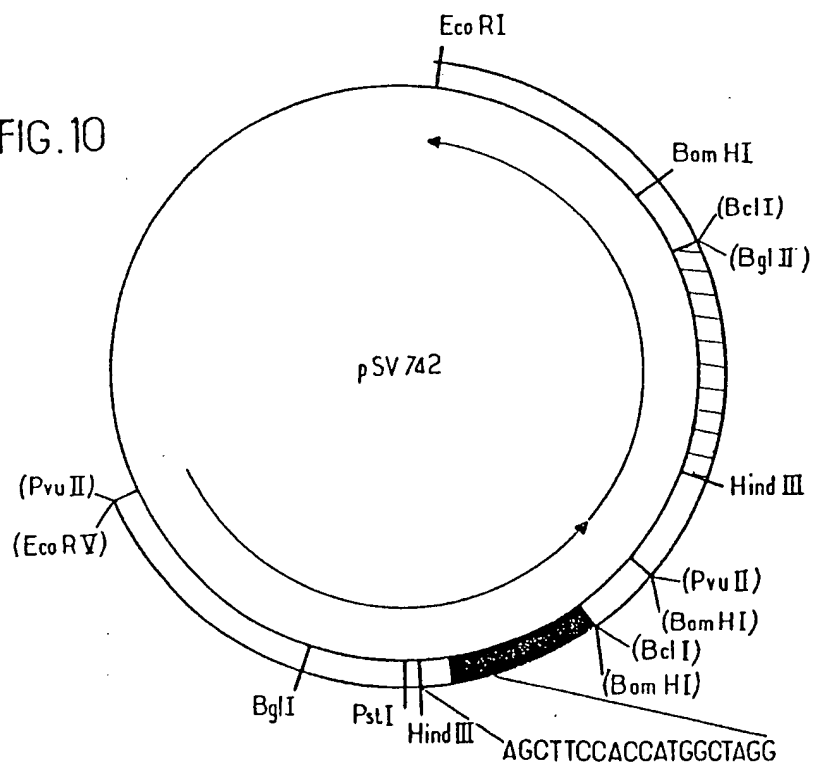


FIG. 11

	MET	ALA	THR	GLY	SER	ARG	THR	SER	LEU

5'	AGCTTACC	ATG	GCT	ACA	GGC	TCC	CGG	ACG	TCC CTG

	LEU	LEU	ALA	PHE	GLY	LEU	LEU	CYS	LEU

	CTC	CTG	GCT	TTT	GGC	CTG	CTC	TGC	CTG

	PRO	TRP	LEU	GLN	GLU	GLY	SER	ALA	ALA	3'

	CCC	TGG	CTT	CAA	GAG	GGC	AGT	GCT	GCA	

FIG. 12

-20
 MET ALA ARG MET GLN LEU LEU SER CYS ILE ALA
 5' AGCTTCACC ATG GCT AGG ATG CAA CTC CTG TCT TGC ATT GCA
 Hind III
 LEU SER LEU ALA LEU VAL THR ASN SER ALA PRO THR SER SER SER
 CTA AGT CTT GCA CTT GTC ACA AAC AGT GCA CCT ACT TCA AGT TCT
 -1 1
 Hgi AI
 THR LYS LYS THR GLN LEU GLN LEU GLU HIS LEU LEU LEU ASP LEU
 ACA AAG AAA ACA CAG CTA CAA CTG GAG CAT TTA CTT CTG GAT TTA

 GLN MET ILE LEU ASN GLY ILE ASN ASN TYR LYS ASN PRO LYS LEU
 CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC

 THR ARG MET LEU THR PHE LYS PHE TYR MET PRO LYS LYS ALA THR
 ACC AGG ATG CTC ACA TTT AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA

 GLU LEU LYS HIS LEU GLN CYS LEU GLU GLU GLU LEU LYS PRO LEU
 GAA CTG AAA CAT CTT CAG TGT CTA GAA GAA GAA CTC AAA CCT CTG
 Xba I
 GLU GLU VAL LEU ASN LEU ALA GLN SER LYS ASN PHE HIS LEU ARG
 GAG GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC AAA AAC TTT CAC TTA AGA

 PRO ARG ASP LEU ILE SER ASN ILE ASN VAL ILE VAL LEU GLU LEU
 CCC AGG GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA ATA GTT CTG GAA CTA

 LYS GLY SER GLU THR THR PHE MET CYS GLU TYR ALA ASP GLU THR
 AAG GGA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA TAT GCT GAT GAG ACA

 ALA THR ILE VAL GLU PHE LEU ASN ARG TRP ILE THR PHE CYS GLN
 GCA ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC AGA TGG ATT ACC TTT TGT CAA
 133
 Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 AGC ATC ATC TCA ACA CTG ACT TGA TAATTAAGTGCTTCCCACTTAAACATATCAG 3'

FIG.13

-26
MET ALA
5' AGCTTACC ATG GCT
Hind III

THR GLY SER ARG THR SER LEU LEU LEU ALA PHE GLY LEU LEU CYS
ACA GGC TCC CGG ACG TCC CTG CTC CTG GCT TTT GGC CTG CTC TGC

LEU PRO TRP LEU GLN GLU GLY SER ALA⁻¹ ALA¹ PRO THR SER SER SER
CTG CCC TGG CTT CAA GAG GGC AGT GCT GCA CCT ACT TCA AGT TCT

THR LYS LYS THR GLN LEU GLN LEU GLU HIS LEU LEU LEU ASP LEU
ACA AAG AAA ACA CAG CTA CAA CTG GAG CAT TTA CTT CTG GAT TTA

GLN MET ILE LEU ASN GLY ILE ASN ASN TYR LYS ASN PRO LYS LEU
CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC

THR ARG MET LEU THR PHE LYS PHE TYR MET PRO LYS LYS ALA THR
ACC AGG ATG CTC ACA TTT AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA

GLU LEU LYS HIS LEU GLN CYS LEU GLU GLU GLU LEU LYS PRO LEU
GAA CTG AAA CAT CTT CAG TGT CTA GAA GAA GAA CTC AAA CCT CTG
XbaI

GLU GLU VAL LEU ASN LEU ALA GLN SER LYS ASN PHE HIS LEU ARG
GAG GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC AAA AAC TTT CAC TTA AGA

PRO ARG ASP LEU ILE SER ASN ILE ASN VAL ILE VAL LEU GLU LEU
CCC AGG GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA ATA GTT CTG GAA CTA

LYS GLY SER GLU THR THR PHE MET CYS GLU TYR ALA ASP GLU THR
AAG GGA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA TAT GCT GAT GAG ACA

ALA THR ILE VAL GLU PHE LEU ASN ARG TRP ILE THR PHE CYS GLN
GCA ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC AGA TGG ATT ACC TTT TGT CAA

133

Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
AGC ATC ATC TCA ACA CTG ACT TGA TAATTAAGTGCTTCCCACTTAAACATATCAG 3'



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 88 40 2198

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
D,Y	EP-A-0 172 619 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) * Revendications; page 37, ligne 1 - page 38, ligne 14 * ---	1-8,10-12,14,15	C 12 N 5/00 C 12 N 15/00 C 12 P 21/02
Y	THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 102, no. 1, juillet 1987, pages 123-131, Tokyo, JP; K. ONOMICHI et al.: "Expression of amplified cDNA and genomic sequences encoding human interleukin 2 in chinese hamster ovary cells" * En entier * ---	1-8,10-12,14,15	
Y	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 84, no. 9, mai 1987, pages 2638-2642, Washington, DC, US; M.L. BAYNE et al.: "Expression of a synthetic gene encoding human insulin-like growth factor I in cultured mouse fibroblasts" * En entier * ---	1-8,10-12,14,15	
P,Y	GB-A-2 190 382 (HOFFMAN-LA ROCHE & CO. AG) * Revendications * -----	1-8,10-12,14,15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4) C 12 N
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lien de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 07-11-1988	Examineur HUBER-MACK A.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 03.82 (P0402)

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平1-165373

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)6月29日

C 12 N 5/00

B-8515-4B

C 07 K 13/00

8318-4H

C 12 N 15/00

A-8412-4B 審査請求 未請求 請求項の数 15 (全17頁)

⑮ 発明の名称 インターロイキン2産性組換え真核細胞、その製法とベクターおよびインターロイキン2の製法

⑯ 特 願 昭63-219590

⑰ 出 願 昭63(1988)9月1日

優先権主張 ⑱ 1987年9月1日 ⑲ フランス(FR) ⑳ 87 12166

㉑ 発 明 者 ジョアンヌ・リュブケ フランス国31520 ラモンビル・サン・アニユ、リュ・レ
ル
㉒ 発 明 者 ブリジット・ミルー フランス国31450 モンジスカール、シユマン・ド・サフ
ラナ(番地の表示なし)
㉓ 発 明 者 ビルム・ロスカム フランス国31450 モンジスカール、マジユレ(番地の表
示なし)
㉔ 出 願 人 サ ノ フ イ フランス国75008 パリ、アブニユー・ジョルジュ・サン
ク 40番
㉕ 代 理 人 弁理士 青 山 葆 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

インターロイキン2産性組換え真核細胞、その
製法とベクターおよびインターロイキン2の製法

2. 特許請求の範囲

(1) 発現に必要な手段と共に、ジヒドロフロ
レートレグクターゼコード化DNA配列およびシグ
ナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体の1
種のそれであるインターロイキン2ハイブリッド
前駆体コード化DNA配列を含む、インターロイ
キン2産性真核細胞。

(2) ハイブリッド前駆体コード化DNA配列が、
シグナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体
の1種のそれであるヒト起源インターロイキン2
コード化DNA配列である、請求項1記載の真核
細胞。

(3) CHO細胞である、請求項1または請求項
2記載の真核細胞。

(4) 発現に必要な手段と共に、ジヒドロフロ
レートレグクターゼコード化DNA配列およびシグ

ナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体の1
種のそれであるインターロイキン2ハイブリッド
前駆体コード化DNA配列を同時に有するベクタ
ーによって真核細胞をトランスフェクトし、次い
で各々が前の培地よりも高濃度のメトトレキセ
ートを含む連続培地中で生育させることにより、イ
ンターロイキン2を産生するトランスフェクト細
胞を選択することからなる、請求項1〜3のいづ
れか1項記載のインターロイキン2産性真核細胞
の製造法。

(5) 真核細胞がCHO細胞である、請求項4記
載の方法。

(6) ベクターがジヒドロフロレートレグクター
ゼおよびインターロイキン2前駆体に対する1箇
の発現単位のみを有する、請求項4または請求項
5記載の方法。

(7) ベクターが、一方がジヒドロフロレートレ
グクターゼに対するもので他方がインターロイキ
ン2前駆体に対するものである2箇の別々の発現
単位を有する、請求項4または請求項5記載の方

特開平1-165373 (2)

法。

(8)ハイブリッド前駆体が、シグナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体の1種のそれであるヒト起源インターロイキン2コード化DNA配列である、請求項4〜7のいずれか1項記載の方法。

(9)ベクターがプラスミドpSV726およびpSV741のいずれか一方の特徴を有する、請求項4〜8のいずれか1項記載の方法。

(10)発現に必要な手段と共に、ジヒドロフオレートレグクターゼコード化DNA配列およびシグナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2ハイブリッド前駆体コード化DNA配列を有する、発現ベクター。

(11)ジヒドロフオレートレグクターゼおよびインターロイキン2前駆体に対する1個の発現単位のみを有する、請求項10記載のベクター。

(12)一方がジヒドロフオレートレグクターゼに対するもので他方がインターロイキン2前駆体に対するもので

対するものである2個の別々の発現単位を有する、請求項10記載のベクター。

(13)プラスミドpSV726およびpSV741のいずれか一方の特徴を有する、請求項10〜12のいずれか1項記載のベクター。

(14)インターロイキン2産生真核細胞を培養し、その培養培地を収め、培地中に含まれるインターロイキン2を他の成分から分離することからなる方法であって、培養細胞が、発現に必要な手段と共に、ジヒドロフオレートレグクターゼコード化DNA配列およびシグナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2ハイブリッド前駆体コード化DNA配列を同時に有するベクターによってトランスフェクトされ、次いで、各々が前の培地よりも高濃度のメトトレキセートを含む連続培地中での培養によって選択された、真核細胞に由来するものである、インターロイキン2の製造法。

(15)請求項14の方法によって得られたインターロイキン2。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明はインターロイキン2産生組織換え真核細胞に関する。本発明はさらにこれらの細胞を製造する方法とベクターに関する。また、本発明はさらにこれら細胞の培養によるインターロイキン2の製造法に関する。

[発明の構成]

本発明による真核細胞はその発現に必要な手段と共に、ジヒドロフオレートレグクターゼコード化DNA配列およびシグナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2ハイブリッド前駆体コード化DNA配列を含む。

これら組織換え真核細胞は、その発現に必要な手段と共に、ジヒドロフオレートレグクターゼコード化DNA配列およびシグナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2ハイブリッド前駆体コード化DNA配列を有するベクターによって真核細胞をトラン

スフェクトし、次いで各々が前の培地よりも高濃度のメトトレキセートを含む連続培地中で生育させることにより、インターロイキン2を産生するトランスフェクト細胞を選択することからなる方法によって得られる。

[従来の技術および発明の課題]

インターロイキン2はリンホカインの1種である。すなわち、それは抗原またはミトゲン化合物による活性化にตอบสนองして哺乳類の成熟Tリンパ球によって分泌される。それは免疫反応に関与する相異なるタイプの細胞の増殖と分化に作用することによって重要な役割をはたす[アール・ジェイ・ロブ(R. J. Robb)(1984)、イミュノロジー・ツディ(Immunol. Today)、5、203-209]。

ヒト起源のインターロイキン2は特別によく研究されてきている。それは3位のスレオニン残基に結合したテトラサッカライドを有する133個のアミノ酸からなる蛋白質である(エイチ・エス・コンラド(H. S. Conradt)ら、(1986)、カ

特開平1-165373 (3)

ーボハイドレート・リサーチ(Carbohydr. Res.), 149, 443-450]。成熟トリンパ球はまず153個のアミノ酸の前駆体としてそれを合成分泌し、次いで小胞体で切断して20個のアミノ酸からなるシグナルペプチドを除去し、さらにゴルジ装置でグリコシル化したのち、グリコシル化した成熟蛋白質と称する133アミノ酸の蛋白質としてそれを分泌する。

ヒト起源のインターロイキン2の生物学的性質は、ガン、ある種の感染症、寄生虫病などの病気の治療に有用な薬物の有効成分としてそれを使用することを可能にする。この使用には、インターロイキン2をグリコシル化した形で使用するのが好ましいようである。すなわち、実際にサッカライド側鎖は蛋白質を安定化するのに役立ち、これを患者に投与したとき、その耐性を改善するようと思われる。

文献には、健全な末梢リンパ球[イー・エム・ニープ(E. M. Niep)ら、(1984)、ヨーロピアン・ジャーナル・バイオケミストリー(Eur.

J. Biochem), 143, 199-203]から、またジュカルト・ラインなどのリンパ芽球[アール・ジェイ・ロブ(R. J. Robb)ら(1983)、プロシーディング・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 80, 5990-5994]からのインターロイキン2の製造について記載されている。

使用されている方法は、健全なリンパ球の培養に関連した難点のため、また誘導体の必要性のため、不適当であることが証明された。

インターロイキン2をコードする相補的なDNAのクローニング[ティエ・タニグチ(T. Taniguchi)(1983)、ネイチャー(Nature), 302, 305-310]に続いて、遺伝子工学技術によるインターロイキン2の製造に微生物の利用が可能となったことが報告された。ヨーロッパ特許出願A-0089062は、グリコシル化ができない大腸菌(Escherichia coli)およびCOSモンキー細胞の使用の可能性を示している。ヨーロッ

パ特許出願A-0172619はとくに中国産ハムスター卵細胞(CHO細胞)を含む、種々の他の動物細胞の使用を開示する。

トランスフェクションの遂行に際して、真核細胞の集団内に、特別のベクターを現実含有した細胞が存在することを示し得るために、その発現がトランスフェクトされた細胞に選択的利点を与え得るようなDNA配列を有することが前記ベクターにとって有用であることも公知である。

[課題の解決手段]

とくに好ましいDNA配列はジヒドロフオレトレグクターゼ(以下、この酵素をdhfrと略す。)をコードする配列である(スブラマニ(Subramani)ら、((1981)、モレキュラー・セル・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 854-864]。発現ベクターによって運搬されるそういった配列は、機能的な状態のdhfrを合成することができない細胞(DHFR-細胞)のトランスフェクション後に、ヒポキサンテン、グリシンおよびチミジンを含む培地中では、現実ベクターを合体させ

た細胞のみしか生育しないということを可能にする。

その発現に必要な手段と共に、dhfrをコードするDNA配列を有するベクターの使用にかかる興味は、トランスフェクトされた真核細胞が機能的状態のdhfrを合成できる(DHFR+細胞)かあるいは合成できない(DHFR-細胞)にかかわらず、その使用が発現に必要な手段と共に前記ベクターによって運搬されるDNA配列によってコードされた興味ある蛋白質の生産性向上をもたらす増幅方法のはじまりとなりうるという事実によって強化される。この増幅のメカニズムは具体的にはなお不明である。dhfrがメトトレキセート(L-N-(4-((2,4-ジアミノブテリジン-6-イル)メチル)メチルアミノ)ベンゾイル)グルタミン酸)として知られている化合物によって阻害されること、選択的培養培地にメトトレキセートを存在させると大部分の細胞を殺すこと、また生存する細胞は実質的にdhfrを合成することができるようになった細胞のみであることは、知られてい

る。さらに、その発現に必要な手段と共に、dhfrをコードするDNA配列および他の蛋白質をコードするDNA配列を有するベクターを含有した細胞中で、このdhfrの増殖は前記蛋白質の増殖を伴うことが発見された[アール・ジェイ・カウフマン(R. J. Kaufman)に(1982)、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.)、159、601-621]。

本発明者は、その発現に必要な手段と共に、インターロイキン2の天然前駆体をコードするDNA配列とdhfrをコードするDNA配列を同時に運搬するベクターを作成したところ、このベクターは、問題のベクターの1種を合体した真核細胞(およびとくにCHO細胞)の培養において、一時発現の条件下、すなわちその各々が前の培地よりも高濃度のメトトレキセートを含む連続した培地における培養によって高度な生産ラインを選択する前では、dhfrをコードするDNA配列およびこの配列の発現に必要な手段を欠如する点が異なるベクターを合体させた同じタイプの細胞の培養培地

期待された最初のレベルを達成することが可能になることを認めた。かくして、本発明者は、それに関する判断基準を満足させ工業的規模でインターロイキン2の製造を具体化することを可能にさせる解決を提供しようとするものである。

まず第一の態様として、実際に本発明は、その発現に必要な手段と共に、ジヒドロフオレートレグクターゼをコードするDNA配列および、そのシグナルペプチドがヒト生長ホルモンの天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2のハイブリッド前駆体をコードするDNA配列を含む、インターロイキン2を生産する組換え真核細胞に関する。

さらに本発明は、1)その発現に必要な手段と共に、ジヒドロフオレートレグクターゼをコードするDNA配列および、そのシグナルペプチドがヒト生長ホルモンの天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2ハイブリッド前駆体をコードするDNA配列を同時に運搬するベクターによって真核細胞をトランスフェクトし、次いで2)そ

特開平1-165373 (4)

から集めた場合よりも少ない量のインターロイキン2しか培地から集めることを可能にしないことを認めた。

この結果は、健全な末梢リンパ球またはリンパ芽細胞の培養によって得られるインターロイキン2の量の点では有望であるが、他の蛋白質、例えば肝炎Bウイルスの表面抗原またはヒト生長ホルモンについてなされた観察とは反対に、インターロイキン2の製造の場合には、その発現に必要な手段と併用した、dhfrをコードするDNA配列の使用から期待される利点のすべてを引出すことができないことを示す。

本発明者は、さらに検討を継続して、非常に驚いたことには、テストした最初のベクターに関して、インターロイキン2の前駆体をコードするDNA配列の範囲内で、そのシグナルペプチドをコードする部分を、ヒト生長ホルモン(この蛋白質は以下hGHと省略する。)の天然前駆体の1種のシグナルペプチドをコードする配列で置換すると、分泌レベルを改善し、ある種の構成によっては、

の各々が前の培地よりも高濃度のメトトレキセートを含む、連続した培地中で培養して、インターロイキン2を生産するトランスフェクトした細胞を選択することからなる、前記細胞の製造方法に関する。

最後に、本発明は、インターロイキン2を生産する真核細胞を培養し、その培養培地を集め、次いで培地中に含まれるインターロイキン2を他の成分から分離することからなる、インターロイキン2の製造法であって、培養細胞が、その発現に必要な手段と共に、ジヒドロフオレートレグクターゼをコードするDNA配列および、そのシグナルペプチドがヒト生長ホルモンの天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2のハイブリッド前駆体をコードするDNA配列を同時に有するベクターによってトランスフェクトされ、次いでその各々が前の培地よりも高濃度のメトトレキセートを含む、連続した培地中での培養によって選択された真核細胞から得られるものである方法に関する。

特開平1-165373 (5)

特記すべきは、この製造法は、ヒト起源のインターロイキン2の製造に特に適するが、それのみならず、かかる分子が、例えば、診断薬としてあるいは、とくに動物用の薬剤中の活性成分としてとくに興味があると共に、工業的利用の価値がある限り、他の動物起源のインターロイキン2の製造にも利用され得る。

自明なことではあるが、この製造法は、天然に産生するTリンパ球から分泌されるグリコシル化されたインターロイキン2の製造を主として可能とすることを意図されたものである。注目すべきことであるが、この方法は、本発明による真核細胞の培養によって培地中に存在する、不完全グリコシル化され、またはグリコシル化されていない状況のインターロイキン2を製造にも通じている。

本発明を実施するために使用される真核細胞はグリコシル化ができる動物起源の細胞である。これらの細胞の中で、その起源(中国産ハムスター卵細胞)を引用してCHO細胞と通常呼ばれる細胞がとくに通じている。

有するので、メチオニンを除く同じアミノ酸が、2,3,4個のコドン、場合によっては6個のコドンによってさえコードされ得る。シグナルペプチドps-hGHをコードする好ましいヌクレオチド配列を第11図に示すが、これは対応するアミノ酸に各々26個のコドンを与える。

前記DNA配列は同じ発現単位中に含まれ得る。それぞれが自律発現単位に属するのが有利である。これら配列の発現に必要な手段は、真核細胞のトランスフェクションを意図したベクターの構成のために一般に使用されるものから選ばれる。それらはSV40のゲノムから好ましくは導かれるが、これからとくに初期促進剤および/または初期アデニル化シグナルを含むDNA配列をとくに製造することができる[ダブリュ・フィーズ(W. Fiers)(1978)、ネイチャー(Nature)、273、113-120]。

本発明によるベクターの構成は当業者に現在よく知られている技術を必要とする。注目すべきことであるが、前駆体(ps-hGH)-インターロイ

増殖であろうと、ベクターによるトランスフェクションであろうと、その他、現実にはトランスフェクトされた細胞の選択であろうと、これら細胞の使用に関連した技術は、当業者に知られている。その一部を実施例の中に十分詳しく記載する。

本発明を実施するのに必要なベクターは、多様な形をとりうる。それらは、ウイルスゲノム、とくにレトロウイルス、プラスミド、その他コスミッドのゲノムの全てまたは一部からなる。プラスミドが有利に使用される。

本発明によるベクターは、その発現に必要な手段と共に、ジヒドロフォレートレグクラーゼをコードするDNA配列および、そのシグナルペプチドがhGHの天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2のハイブリッド前駆体[この前駆体は以下に次の記号で略称する:(ps-hGH)インターロイキン2]をコードするDNA配列を運搬する。

シグナルペプチドに対応するコード部分は遺伝子コードの読重によって認められた配列の1個を

キン2をコードするDNAに関しては、インターロイキン2の天然前駆体をコードするTリンパ球のメッセンジャーRNAに相補的なDNA[例えば、テイ・タニグチ(T. Taniguchi) et al、(1983)、ネイチャー(Nature)、302、305-310またはエックス・デボス(X. Devos)ら(1983)、ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Res.)、11、4307-4323の業績を参照のこと。]を製造したのち、そのシグナルペプチドをコードする配列を、hGHの天然前駆体の1種のシグナルペプチドをコードする配列で置換することが有利である。

ヒト起源のインターロイキン2の製造のために構成される2種の好ましいベクターはプラスミドpSV726(第6図)およびpSV741(第9図)である。それらはそれぞれdhfrの発現単位および前駆体(ps-hGH)-インターロイキン2の発現単位を含む。これら両プラスミドは発現単位におけるイントロンの存在、性質および位置が基本的に異なる。詳述すると、プラスミドpSV726

特開平1-165373 (6)

は、dhfrをコードする配列のイントロン下流部ならびに前駆体(ps-hGH)-インターロイキン2をコードする配列のイントロン下流部を運搬する。他方、プラスミドpSV741は前駆体(ps-hGH)-インターロイキン2をコードする配列のイントロン上流部を運搬するが、dhfrの発現単位範囲にイントロンを持たない。

本発明のお他の態様によれば、本発明は本発明によるベクターを合体した真核細胞から、その各々が前の培地よりも高濃度のメトトレキセートを含有する連続培地中で前記細胞を培養することによって、選ばれたセルラインに関する。ある培地から次の培地への継代培養は、1L-2の成分のこれ以上の増幅が観察されなくなるまで、続ける。

本発明の実施の態様を下記に示す。それらは勿論単なる例示であって、決して限定を意味するものではない。

実施例

一時の発現の条件下にテストした本発明の2種

バー、プレス(Cold Spring Harbor Press)、米国ニューヨーク(New York)によって1982年に出版された、ティー・マニアス(T. Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning): ア・ラボラトリー・マニュアル(a Laboratory Manual)の題名の著書に記載されている。

下記に記載されるベクターの構成に要する全ての制限酵素は、とくにニュー・イングランド・バイオラブス(New England Biolabs)(米国)により市販されている。

バクテリアファージT4のDNAリガーゼはニュー・イングランド・ニュークリア(New England Nuclear)(米国)から入手できる。

ベクターの構成は第2~10図によって説明され、それらについては下記のキーが採用された。

— プラスミドpBR322から導かれるDNA配列
 □ SV40のゲノムから導かれるDNA配列

のベクターは以下に実施例として記載される高度な生産性の細胞系の製造および次に得られるヒト起源のインターロイキン2(以下、1L-2と略す。)の特徴付けを次に記載する。

1. 両ベクターの構成と一時発現の条件下におけるテスト

プラスミドpSV726およびpSV741

1. 方法

A/ベクターの構成

ベクターの構成は、とくに制限酵素による存在するベクターからDNAフラグメントの単離、オリゴヌクレオチドの化学合成、バクテリオファージT4のDNAリガーゼなどの酵素を用いて適切な場合その末端の修飾後にこれら種々のフラグメントの組立て、エシエリヒア・コリ(Escherichia coli)における細菌の形質転換後にクローニングによるベクターの選択、および水にその精製を含有する。

それは当業者に周知の技術を要する。

これらの技術は、コールド・スプリング・ハー

XXXXXXXX

マウスのアルファグロビンをコードする遺伝子から導かれるDNA配列

HindIII BamHI

ヒトインターロイキン2の天然前駆体または、チロジン残基が2位でアラニン残基により置換されているバリエーションをコードする配列を構成するDNA配列

HindIII BamHI

前駆体(ps-hGH)-1L-2をコードする配列を構成するDNA配列

XXXXXXXX

dhfrをコードするDNA配列

B/ヒト起源のインターロイキン2の天然前

駆体をコードするDNA配列の製造

ヒトTリンパ球から単離された、1L-2の前駆体をコードするメッセンジャーRNAに相補するDNAをクローンした。

得られるヌクレオチド配列は、対応する前駆体

のアミノ酸を上側に示したコドンとしてヌクレオチドをグループ化して、第1図に示されるDNA配列(5'-3'要素)に含まれる。

C/真核細胞の使用

a. 選定

ジー・ウルラウブ(G. Ullrich)とエル・チェイシン(L. Chasin)[(1980), プロシーディングス・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、77、4216-4220]によって選ばれたDHFR-CHO細胞のDXB11菌株を選定した。

b. 一時発現の操作

エル・ソンバイラック(L. Sonpayrac)とケイ・グナ(K. Danna)[(1981)プロシーディングス・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、78、7575]によって記載されたプロトコルを使用した。

各実験について、5%(v/v)子牛胎児血清(ギ

IL-2-依存マウスT-リンパ球系CTL-2)[ビー・ベイカー(P. Baker)(1979)ジャーナル・オブ・イクスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Med.)、149、173]の増殖について、C/b項の場合のように集めた培地の生物活性をティエ・モスマン(T. Mosmann)[(1983)、ジャーナル・オブ・イミュノロジカル・メソッド(J. Immunol. Methods)、65、55-63]の比色テストによって測定する。リンホカイン・リサーチ(Lymphokine Research)[(1984)、4、193-227]に記載された対照製剤を対照として使用する。

2. プラスミドpSV726

A/構成

プラスミドpSV726の構成はプラスミドpSV700から始める(第2図)。

プラスミドpSV700は5個のDNA断片の組み立てから生ずる。

—SV40ゲノム[ダブリュ・フィアーズ(W. Fiers)(1978)、ネイチャー(Nature)、

特開平1-165373 (7)

ブグ(Gibco))を添加したアルファ-MEM(ギブグ(Gibco)、米国)5mlを含む、直径6cmのベトリ皿に 5×10^5 の細胞を接種する。

37℃で24時間培養したのち、細胞をPBS緩衝液[アール・ダルベッコ(R. Dulbecco)とエム・フォグト(M. Vogt)、ジャーナル・イクスペリメント・メディシン(J. Exp. Med.)、99(1954)、167]5mlで洗浄し、次いでpH7.3のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、HCl(またはtris-HCl)0.05モル/l、500000ダルトンのDEAE-デキストラン(シグマ(sigma)、米国)0.2mgおよびプラスミドDNA10μgを加えたアルファ-MEM1mlを添加した。

37℃で7時間培養を行い、細胞をPBS緩衝液5mlで洗浄したのち、子牛胎児血清2%(v/v)を加えたアルファ-MEM5mlを添加した。

次いで、細胞を37℃で4日間培養する。続いて、培地を棄め、IL-2タイプ活性を測定するために使用する。

D/IL-2タイプ活性の測定

273、113-120]から導かれ、かつこのウイルスの初期プロモーターを含む、342個の塩基対のフラグメントPvuII-HindIII(以下bpと略す)。

—ヒトリンパ球の中で合成されるIL-2の天然前駆体をコードするDNA配列を含む、504bpのフラグメントHindIII-BamHI(第1図)。

—マウスのアルファ-グロブリンの遺伝子[ワイ・ニシオカ(Y. Nishio)とビー・レーダー(P. Leder)(1979)、セル(Cell)、18、875-882]から導かれ、かつこの遺伝子の末端イントロンを含む、305bpのフラグメントBamHI-BaII。

—SV40のゲノムから導かれ、かつこのウイルスの初期アデニル化シグナルを含む、133bpのフラグメントHpaI-BamHI、および

プラスミドpBR322[エフ・ポリバル(F. Bolivar)(1977)、ジーン(Gene)、2、

95-113]から導かれる。2672bpのフラグメントBamH I-Pvu II。

次いで、フラグメントHind III-BamH I (第1図のコード要素の5'末端に位置するヌクレオチド配列AGCTTCCACAATGTACAGGは、コドンATGを封入するヌクレオチドの範囲で、エム・コザク(M. Kozak)[(1984)、ヌクレック・アッショッド・リサーチ(Nucleic Acids Res.)、12, 857-872]によって記載されたコンセンサス配列CCACCATGGに一致する配列を与えるように、合成配列AGCTTCCACCATGGCTACGで置換される。これはプラスミドpSV703(第3図)を与える。

次いで、プラスミドpSV703のセグメントHind III-BamH I (その5'→3'ストランドを第12図に示す)の上流部分に位置し、かつIL-2の天然前駆体の修飾シグナルペプチド(このシグナルペプチドは、コザク(Kozak)のコンセンサス配列に一致する配列の採用のため、チロジン残基の代りに2位にアラニン残基を含む)に対応し、

モレキュラー・エンド・セルラー・バイオロジー(Molecular and Cellular Biology)、1, 854-864]から導かれる2677bpのフラグメントPvu II-EcoR Iで置換される。

プラスミドpSV726は次のものを含む。

——前駆体(ps-hGH)-IL-2のための発現単位。この単位はそのプロモーターとしてSV40の初期促進剤を有する。それは(ps-hGH)-IL-2の前駆体をコードする配列の下流、マウスのアルファグロビンの遺伝子の第2イントロンを含む配列およびSV40の初期ポリアダニル化シグナルを含む。および

——dhfrのための発現単位。この単位はそのプロモーターとしてSV40の初期プロモーターを有する。それは、dhfrをコードする配列の下流部、SV40のゲノム上にグブリュ、フィアーズ(W. Fiers)のメモによれば位置4693と4083におけるMbo I位置間の配列を含むが、その配列はSV40の1抗原イン

特開平1-165373 (8)

同時に成熟IL-2の第一アミノ酸に対応する配列を含むHind IIIとHgi A Iの制限部位の間のDNAセグメントは、その5'→3'コード要素が第11図に示される合成された二本鎖オリゴヌクレオチドで置換される。

この合成配列はその9番目のヌクレオチドからhGHの天然前駆体の1種のシグナルペプチド(このシグナルペプチドのアミノ酸配列は第11図に示され、各アミノ酸は対応するコドンの上にある)(以下、hGHのシグナルペプチドと略称する)および成熟IL-2の第一アミノ酸をコードする。

得られたプラスミドはプラスミドpSV706(第4図)である。前駆体は(ps-hGH)-IL-2をコードする配列を有するセグメントHind III-BamH Iを第13図に示す。

最後に、プラスミドpSV706の185bpのEcoR IとEcoRVの制限部位間のフラグメントは、ATCCコレクションにNO. 37146として寄託されている、プラスミドpSV-dhfr[エス・ズブラマニ(S. Subramani)ら、(1981)、

トロンを含む、およびSV40の初期ポリアダニル化シグナルを含む。この単位はプラスミドpSV2-dhfrから導かれるフラグメントPvu II-EcoR I中に含まれる

B/プラスミドpSV726の使用に関連し

た利点

比較実験を行った。

プラスミドpSV703、pSV720(下記に示す)およびpSV726を一時発現の条件下に試験した(方法を参照)。各プラスミドによってトランスフェクトされる細胞が能力としてもつIL-2分泌レベルを評価するため、各培養上清液のIL-2タイプ活性を測定した(上記のプロトコルによる)。

プラスミドpSV720(第5図)はプラスミドpSV703の誘導体である。それは、プラスミドpSV703の185bpのEcoR IとEcoRVの間のフラグメントを、プラスミドpSV2-dhfrから導かれる2677bpのフラグメントPvu II-EcoR Iで置換することにより得られる。

特開平1-165373 (9)

それ故に、プラスミドpSV720とpSV726はdhfrのための同一発現単位を有する。両者は、IL-2の前駆体のシグナルペプチドをコードするそれぞれのDNA配列の点で異なるのみである。

この配列は、プラスミドpSV720の場合、IL-2の天然前駆体のシグナルペプチドのパリアントをコードし、プラスミドpSV726の場合、hGHのシグナルペプチドをコードする。

下記第1表はこの実験の結果を示す：

第1表

プラスミド	IL-2 活性(U/ml)
pSV703	228 ± 112
pSV720	34 ± 29
pSV726	153 ± 68

この表は、dhfrのための発現単位をプラスミド(pSV703)に導入したと関連して一時発現の条件下に分泌の低下を示す(プラスミドpSV720)。それは、IL-2の天然前駆体のシグナルペプチドのパリアントをコードする配列を、hGHのシグナルペプチドをコードする配列(プ

ラスミドpSV726)で置換することによって、両者に分泌レベルを改善し、ひいては原プラスミド(プラスミドpSV703)について定置されたものに実質的に均等なレベルに到達することが可能となることを、明らかに意味している。

3. プラスミドpSV741

A/構成

プラスミドpSV741の構成はプラスミドpSV739(第7図)にはじまる。

プラスミドpSV739は5種のDNAフラグメントの組立てにより導かれる。

——SV40のゲノムから導かれ、かつSV40の初期プロモーターの一部を含む、777bpのフラグメントEcoRV-BglI、

——プラスミドpL1[エイチ・オカヤマ(H. Okayama)とピー・バーグ(P. Berg)(1983)、モレキュラー・エンド・セラー・バイオロジー(Molecular and Cellular Biology)、3,280-289]から導かれ、かつ、SV40の初期プロモーターのフラグメントEco

RV-BglIの欠失部分および蛋白質VP2の後期メッセンジャーRNA19Sと蛋白質VP1[ダブリュ・フィアーズ(W. Fiers)(1978)、ネイチャー(Nature)、273、113-120]の後期メッセンジャーRNA16Sの両イントロンを含む、239bpのフラグメントBglI、

——リンカーPstI-HindIIIによって拡張されたプラスミドpSV706の521bpのフラグメントHindIII-BamHIからなる、フラグメントPstI-BamHI(第13図)。このフラグメントは前駆体(ps-hGH)-IL-2をコードするDNA配列を含む。

——SV40のゲノムから導かれ、かつこのウイルスの初期ポリアデニル化シグナルを含む988bpのフラグメントBclI-EcoRIおよび

——プラスミドpBR322から導かれる2295bpのフラグメントEcoRI-PvuII。

プラスミドpSV741(第9図)は、プラスミ

ドpSV739のフラグメントBamHI-EcoRIを、フラグメントPvuII-EcoRIで置換することによって得られるが、後者は、SV40のゲノムから導かれ、かつこのウイルスの初期ポリアデニル化シグナルを含む988bpのフラグメントBclI-EcoRIとプラスミドのpSV2-dhfrから導かれるフラグメントPvuII-BglIとから組立てて得られる。

プラスミドpSV741は下記のものを含む：

——前駆体(ps-hGH)-IL-2の発現単位。

この単位はそのプロモーターとしてSV40の初期プロモーターを有する、それは、IL-2の前駆体をコードする配列の上流部、SV40の2番目のイントロンからなる配列およびこの配列の下流部、SV40の初期ポリアデニル化シグナルを有する。および

——dhfrのための発現単位。この単位はSV40の初期プロモーター、dhfrをコードするDNA配列、およびこの配列の下流部、中間体イントロンなしのSV40の初期ポリアデニル

化シグナルを含有する。

B/プラスミドpSV741の使用に関連した利点

比較実験を実施した。

プラスミドpSV739、pSV741およびpSV742(下記参照)を一時発現の条件下(方法参照)にテストした。

各プラスミドによってトランスフェクトされた細胞が可能とするIL-2分泌レベルを評価するため、各培養培地のIL-2-タイプ活性を測定した(上記プロトコルに従う。)

プラスミドpSV742(第10図)はプラスミドpSV739から構成された。

プラスミドpSV739(第13図)の260bpのフラグメントHindIII-XbaIは、プラスミドpSV703(第3図)の244bp(第12図)のフラグメントHindIII-XbaIによって置換された。得られるプラスミドはプラスミドpSV740(第8図)である。

プラスミドpSV742は、プラスミドpSV7

pSV741	46 ± 4
pSV742	7 ± 2

この表は、dhfrのための発現単位をプラスミドpSV740に導入することに関連して一時発現の条件下に分泌の低下を示す(プラスミドpSV742)。それは、IL-2の天然前駆体のシグナルペプチドのバリエーションをコードする配列を、hGHのシグナルペプチドをコードする配列(プラスミドpSV741)で置換することによって、IL-2分泌レベルを顕著に改善することが可能となることを明らかに示す。

II. 高度に生産性のあるセルラインの調整

DXB11のDHFR-CHO細胞はプラスミドpSV726とpSV741のいずれかでトランスフェクトされた。

エフ・グラハム(F. Graham)とエー・ファン・デル・エブ(A. Van der Eb)[(1973)、ビロロジー(Virology)、54、436-539]に記載された操作に従った。

細胞を、10%(v/v)子牛胎児血清、ゲンタマ

特開平1-165373 (10)

40のフラグメントEcoRI-BamHIをフラグメントPvuII-EcoRIで置換することによって得られるが、後者はプラスミドpSV2-dhfrから導かれる1103bpのフラグメントBglII-PvuIIとSV40のゲノムから導かれ、かつこのウイルスの初期ポリアデニル化シグナルを含む、988bpのフラグメントEcoRI-BamHIとの組立てから導かれる。

それ故に、プラスミドpSV741とpSV742はdhfrのための同一の発現単位を有する。両者はIL-2の前駆体のシグナルペプチドをコードするそれぞれのDNA配列の組成の点で異なるのみである。この配列は、プラスミドpSV742の場合、IL-2の天然前駆体のシグナルペプチドのバリエーションをコードし、プラスミドpSV741の場合、hGHのシグナルペプチドをコードする。

下記の第2表はこの実験の結果を示す:

プラスミド	IL-2 活性(U/ml)
pSV740	171 ± 10

イシン20μg/ml、チロシン6.0μg/mlおよびL-グルタミン300μg/mlを含む。アルファ-MEM(ギブコ(Gibco))(以下、非選択的培地という。)中で最初に増殖させた。

洗浄過程を経て、直径10cmのペトリ皿に、8・10⁶の割合で前日に接種した細胞に非選択培地を加え、さらにサケ精子DNAを加えることなしに、リン酸カルシウムの存在下でプラスミド10μgを加える。このようにして得られた細胞を37℃で7日間培養する。

次いで、子牛胎児血清5%(v/v)を含む、アルファ-MEM中で、細胞を37℃で3日間培養する。この培養が終わったとき、細胞を、添加塩を含む最小必須の培地からなり、製品No.041-1095でギブコ(Gibco)によって市販されている、培地を含むペトリ皿に、皿当たり5・10⁶の割合で、分配する。ここで使用される培地に添加したのは次のものである。ギブコ(Gibco)の透析子牛胎児血清(10%、v/v)、ゲンタマイシン(20μg/ml)、チロシン(50μg/ml)、L-グルタ

特開平1-165373 (11)

ミン(300 $\mu\text{g}/\text{ml}$)およびレブリン(150 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。このように補足して、この培地は、下に引用する選択的培地を構成する。

このようにして得られた細胞は37℃で2週間培養され、なお選択的培地は3日ごとに更新する。この培養が終わったときに観察されるコロニーは実際にプラスミドを合体した細胞から主として導かれる。これらのコロニーは分離され、再び別々に培養し、IL-2を産生する能力を確認するために、IL-2タイプ活性を測定することによりテストされる。

かくして、トランスフェクション後に、プラスミドpSV726を有する、347コロニーを単離し、陽性であることを認めた。

最も生産性が高いコロニー(初期細胞数 4×10^3 から始まり、4日後に測定したところ、IL-2 35000~50000単位/ ml)を培養した。細胞を4種の組成の選択培地で連続して継代培養し、各培地は、エフ・アルト(F. Alt)ら、[(1978)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル

・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)、253、1357-1570]により記載された方法にて、前の培地よりも高濃度(0.02、0.05、0.1、次いで0.2 μM)のメトレキセート(アメトプテリン、シグマ(Sigma))を含有した。この操作の終末段階で、数種の高生産性ラインを選ぶことができた。

すなわち、プラスミドpSV726でトランスインフェクトされた、ライン109.12は、培養4日後に、活性で表現して、IL-2分泌レベル250000単位/ ml の能力がある。

Ⅲ. ラインによって分泌されたIL-2の特徴付け

Ⅱ章に記載した高生産性ラインの大規模培養は培養した上澄液を処理し、他の成分を分離したのち、特徴付けができる程度の十分な量の、細胞によって分泌された蛋白質を提供した。

1. IL-2の精製

IL-2は培養上清1リットルから精製した。上澄液をまず濃縮し、予め0.05M酢酸アン

モニウムでpH4.5に平衡化したセファロース(Sephacrose)(商標)アガロース(エス・ファストフロー・ファルマシア・ファイン・ケミカル(Pharmacia Fine Chemical)、スウェーデン)のカラムによるイオン交換クロマトグラフィーで最初の精製に付す。溶出は、0.5MのNaCl、次いで0.5MのNaClを加えた。0.05M酢酸アンモニウム(pH5.5)を用いて行われる。

IL-2タイプ活性の測定により生物学的に活性があると認められた、溶出フラクションを合せ、合せたフラクションのプールを逆相カラムによる液体クロマトグラフィーに付す。選ばれた担体はC₁₈-グラフトしたシリカゲルである。カラム寸法は1.0×25.0cmである。

溶出は、0.1%(v/v)のトリフルオロ酢酸を含む水溶液中5~100%(v/v)直線勾配のアセトニトリルで流速4 ml/min で80分間行う。

生物学的に活性な溶出フラクションを合せ、合せたフラクションのプールを、寸法2.1×10.0cmのカラム中C₁₈-グラフトしたシリカゲルに

で、上記と同じ条件、とくに溶出条件で上記と同じタイプのクロマトグラフィーに付す。

生物学的活性をもち、ドデシル硫酸ナトリウムの存在下にポリアクリルアミドゲルによる電気泳動(レムリ(Laemmli)(1970)、ネイチャー(Nature)、277、680-685)の結果によればIL-2純度95%以上を有する、このクロマトグラフィーから集めた溶出フラクションのプールは、IL-2を特徴付ける物質を構成する。

2. アミノ末端配列の定量によるIL-2の特徴付け

処理すべきサンプルを、ヘキサジメスリンブromid(またはポリブレン)フィルターの表面上におく。フィルターを、クロマトグラフ(モデル130A-アブライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems))を備えた蛋白質シーケンサー(モデル470A、アブライド、バイオシステムズ、米国)に導入する。これは結局生成したフェニルチオヒダントイン酸誘導体を分析する。

この定量の結果は、天然物について既に公開さ

れている配列と一致する[アール・ロップ(R. Robb)ら(1984)、プロシーディングス・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、81、6486-6490]。

この配列のはじめの10個のアミノ酸は次のとおりである：

1 10
Ala-Pro-Thr-Ser-Ser-Ser-Thr-Lys-Lys-Thr

アラニン(N-末端の位置で検出される唯一の残基である。これは、前駆体(ps-hGH)-IL-2が分泌中に誤りなく切断されることを確認させる。

結論として、これらの実施例は、発現に必要な手段を用いて、ジヒドロオレートレダクターゼをコードする配列を有するベクターによる細胞トランスフェクションに基づいて、選択および/または増幅のシステムに固有の性質を利用することによって、インターロイキン2の製造のために確信をもって真核細胞の使用を可能とする、発明の

特開平1-165373 (12)

価値を明白に示す。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、ヒトTリンパ球IL-2前駆体を暗号化するメッセンジャーRNAに相補的なDNAをクローンして得たDNA配列である。

第2-10図は、それぞれ、ベクターpSV700、pSV703、pSV720、pSV706、pSV726、pSV739、pSV741、pSV740およびpSV742の構成を示す図である。

第11図は、HindIIIとHgiA1制限部位間のDNAセグメントを置換する合成2本鎖オリゴヌクレオチドを示す。

第12図は、pSV703のセグメントHindIII-BamHIのストランドを示す。

第13図は、前駆体(ps-hGH)-IL-2コード配列をもつセグメントHindIII-BamHIを示す。

第14図はプラスミドpSV706の521bpフラグメントHindIII-BamHIの配列を示す。

FIG. 2

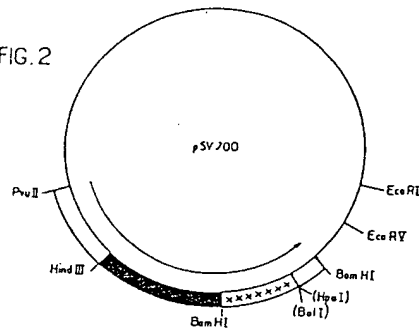


FIG. 3

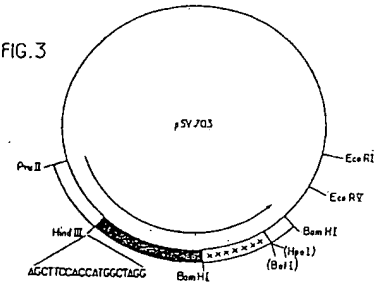


FIG. 5

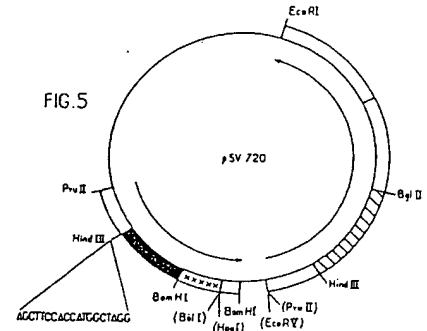


FIG.1

```

      -20
      MET TYR ARG MET GLN LEU LEU SER CYS ILE ALA
5' AGCTCCACA ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT TGC ATT GCA
      -1 1
      LEU SER LEU ALA LEU VAL THR ASN SER ALA PRO THR SER SER SER
      CTA AGT CTT GCA CTT GTC ACA AAC AGT GCA CCT ACT TCA AGT TCT

      THR LYS LYS THR GLN LEU GLN LEU GLU HIS LEU LEU LEU ASP LEU
      ACA AAG AAA ACA CAG CTA CAA CTG GAG CAT TTA CTT CTG GAT TTA

      GLN MET ILE LEU ASN GLY ILE ASN ASN TYR LYS ASN PRO LYS LEU
      CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC

      THR ARG MET LEU THR PHE LYS PHE TYR MET PRO LYS LYS ALA THR
      ACC AGG ATG CTC ACA TTT AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA

      GLU LEU LYS HIS LEU GLN CYS LEU GLU GLU GLU LEU LYS PRO LEU
      GAA CTG AAA CAT CTT CAG TGT CTA GAA GAA GAA CTC AAA CCT CTG

      GLU GLU VAL LEU ASN LEU ALA GLN SER LYS ASN PHE HIS LEU ARG
      GAG GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC AAA AAC TTT CAC TTA AGA

      PRO ARG ASP LEU ILE SER ASN ILE ASN VAL ILE VAL LEU GLU LEU
      CCC AGG GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA ATA GTT CTG GAA CTA

      LYS GLY SER GLU THR THR PHE MET CYS GLU TYR ALA ASP GLU THR
      AAG GGA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA TAT GCT GAT GAG ACA

      ALA THR ILE VAL GLU PHE LEU ASN ARG TRP ILE THR PHE CYS GLN
      GCA ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC AGA TGG ATT ACC TTT TGT CAA

      133
      Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
      AGC ATC ATC TCA ACA CTG ACT TGA TAATTAAGTGCTTCCCACTTAAACATATCAG 3'

```

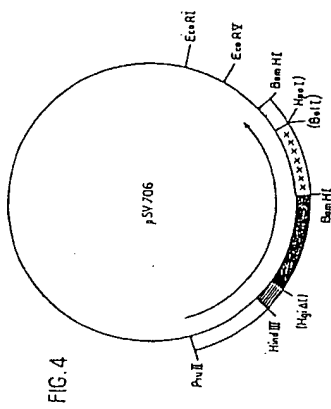


FIG. 4

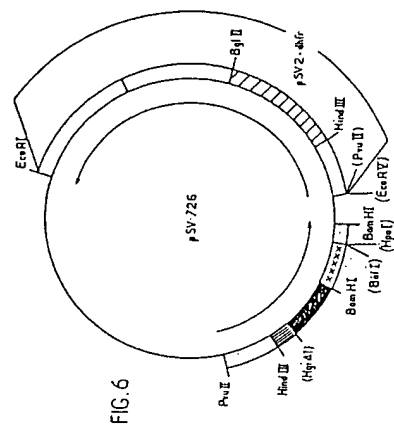


FIG. 6

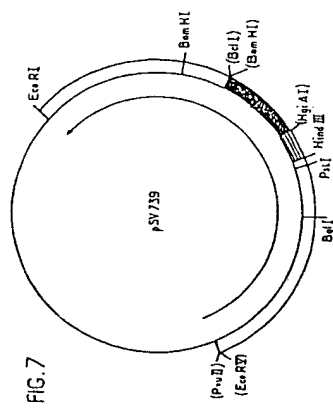


FIG. 7

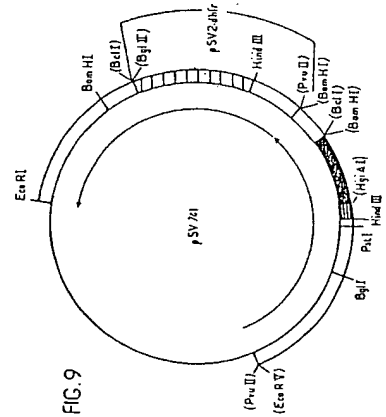


FIG. 9

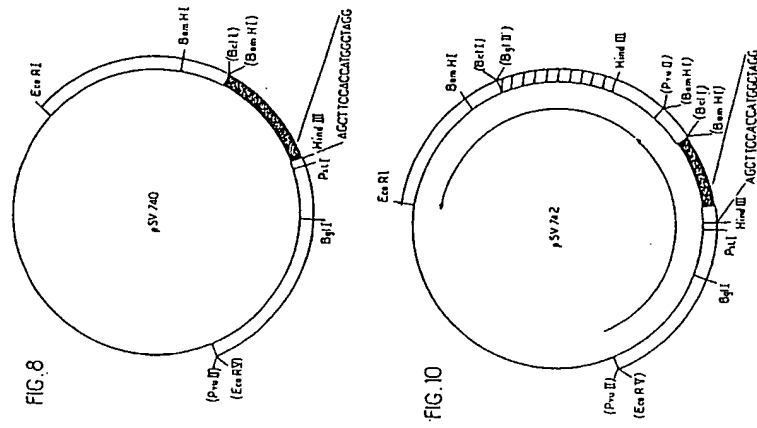


FIG. 11

MET ALA THR GLY SER ARG THR SER LEU
 5' AGCTTACC ATG GCT ACA GGC TCC CGG ACG TCC CTG

LEU LEU ALA PHE GLY LEU LEU CYS LEU
 CTC CTG GCT TTT GGC CTG CTC TGC CTG

PRO TRP LEU GLN GLU GLY SER ALA ALA 3'
 CCC TGG CTT CAA GAG GGC AGT GCT GCA

FIG.12

-20
 MET ALA ARG MET GLN LEU LEU SER CYS ILE ALA
 5' AGCTTCACC ATG GCT AGG ATG CAA CTC CTG TCT TGC ATT GCA
 Hind III
 LEU SER LEU ALA LEU VAL THR ASN SER ALA PRO THR SER SER SER
 CTA AGT CTT GCA CTT GTC ACA AAC AGT GCA CCT ACT TCA AGT TCT
 Hgi I
 THR LYS LYS THR GLN LEU GLN LEU GLU HIS LEU LEU LEU ASP LEU
 ACA AAG AAA ACA CAG CTA CAA CTG GAG CAT TTA CTT CTG GAT TTA

 GLN MET ILE LEU ASN GLY ILE ASN ASN TYR LYS ASN PRO LYS LEU
 CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC

 THR ARG MET LEU THR PHE LYS PHE TYR MET PRO LYS LYS ALA THR
 ACC AGG ATG CTC ACA TTT AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA

 GLU LEU LYS HIS LEU GLN CYS LEU GLU GLU GLU LEU LYS PRO LEU
 GAA CTG AAA CAT CTT CAG TGT CTA GAA GAA GAA CTC AAA CCT CTG
 Xba I
 GLU GLU VAL LEU ASN LEU ALA GLN SER LYS ASN PHE HIS LEU ARG
 GAG GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC AAA AAC TTT CAC TTA AGA

 PRO ARG ASP LEU ILE SER ASN ILE ASN VAL ILE VAL LEU GLU LEU
 CCC AGG GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA ATA GTT CTG GAA CTA

 LYS GLY SER GLU THR THR PHE MET CYS GLU TYR ALA ASP GLU THR
 AAG GGA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA TAT GCT GAT GAG ACA

 ALA THR ILE VAL GLU PHE LEU ASN ARG TRP ILE THR PHE CYS GLN
 GCA ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC AGA TGG ATT ACC TTT TGT CAA
 133
 Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 AGC ATC ATC TCA ACA CTG ACT TGA TAATTAAGTGCTTCCCACTTAAACATATCAG 3'

特開平1-165373 (17)

FIG.13

-26

MET ALA

5' AGCTTACC ATG GCT

Hind III

THR GLY SER ARG THR SER LEU LEU LEU ALA PHE GLY LEU LEU CYS
ACA GGC TCC CGG ACG TCC CTG CTC CTG GCT TTT GGC CTG CTC TGC

LEU PRO TRP LEU GLN GLU GLY SER ALA⁻¹ ALA¹ PRO THR SER SER SER
CTG CCC TGG CTT CAA GAG GGC AGT GCT GCA CCT ACT TCA AGT TCT

THR LYS LYS THR GLN LEU GLN LEU GLU HIS LEU LEU LEU ASP LEU
ACA AAG AAA ACA CAG CTA CAA CTG GAG CAT TTA CTT CTG GAT TTA

GLN MET ILS LEU ASN GLY ILE ASN ASN TYR LYS ASN PRO LYS LEU
CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC

THR ARG MET LEU THR PHE LYS PHE TYR MET PRO LYS LYS ALA THR
ACC AGG ATG CTC ACA TTT AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA

GLU LEU LYS HIS LEU GLN CYS LEU GLU GLU GLU LEU LYS PRO LEU
GAA CTG AAA CAT CTT CAG TGT CTA GAA GAA GAA CTC AAA CCT CTG

Xba I

GLU GLU VAL LEU ASN LEU ALA GLN SER LYS ASN PHE HIS LEU ARG
GAG GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC AAA AAC TTT CAC TTA AGA

PRO ARG ASP LEU ILE SER ASN ILE ASN VAL ILE VAL LEU GLU LEU
CCC AGG GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA ATA GTT CTG GAA CTA

LYS GLY SER GLU THR THR PHE MET CYS GLU TYR ALA ASP GLU THR
AAG GGA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA TAT GCT GAT GAG ACA

ALA THR ILE VAL GLU PHE LEU ASN ARG TRP ILE THR PHE CYS GLN
GCA ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC AGA TGG ATT ACC TTT TGT CAA

133

Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

ATC ATC ATC TCA ACA CTG ACT TGA TAATTAAGTGCTTCCCACTTAAACATATCAG 3'